

On-chip elektromembranekstraksjon

Ett nytt og effektivt flowsystem med kontinuerlig ekstraksjon av legemidler med påfølgende online-analyse

Sunniva Taule Foss



Faggruppen for Legemiddelanalyse,

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi,

Farmasøytisk institutt,

Det matematisk-naturvitenskapelige Fakultet,

UNIVERSITETET I OSLO

2010

On-chip elektromembranekstraksjon

Ett nytt og effektivt flowsystem med kontinuerlig ekstraksjon av legemidler med påfølgende online-analyse

Sunniva Taule Foss

Masteroppgave ved Faggruppen for Legemiddelanalyse,
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt,
Universitetet i Oslo.

Det praktiske laboratoriearbeidet ble gjennomført ved
Insitut for Farmaci og Analytisk Kemi
Det Farmaceutisk Fakultet, Københavns Universitet
i perioden fra august 2009 til februar 2010

Veiledere:

Professor Stig Pedersen-Bjergaard

Adjunkt, Ph.d. Nickolaj Jacob Petersen,

Professor Steen Honorè Hansen

Lektor, ph.d. (scient.) Henrik Jensen

Forord

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder Stig Pedersen-Bjergaard for god veiledning gjennom hele mitt arbeid med masteroppgaven. Jeg setter stor pris på den gode oppfølgingen og tilbakemeldingene som ble gitt underveis og via mail under tiden i København.

Videre vil jeg sende en stor takk til min hovedveileder ved Insitut for Farmaci og Analytisk Kemi i København, Nickolaj Jacob Petersen. Jeg setter stor pris på den tid som ble gitt til meg og mitt prosjekt, for all hjelp, gode råd og svært god veiledning! Jeg vil også takke mine to andre veiledere i København, Steen Honorè Hansen for engasjement og gode ideer og forslag som førte til framdrift i prosjektet, og ikke minst for å ha tatt Linda og meg så godt i mot på instituttet, Henrik Jensen for nyttige råd og innspill.

Jeg vil ellers takke medelever for oppmuntring og samhold, og ikke minst Linda som bidro stort til at jeg trivdes og fikk et topp opphold i København. Jeg angrer ikke ett sekund på at jeg tok sjansen på et halvår i Danmark! Jeg vil også takke mamma for omsorg, støtte og korrekturlesing, samt resten av familien for datahjelp og andre bidrag, og venner som har bidratt med glede og hygge i min travle hverdag.

Oslo, mai 2010

Sunniva Taule Foss

Innholdsfortegnelse

INNHALDSFORTEGNELSE.....	4
1. SAMMENDRAG	7
2. FORKORTELSER	8
3. INTRODUKSJON	10
4. TEORI	15
4.1 PRINSIPP FOR ELEKTROMEMBRANEKSTRAKSJON	15
4.2 ELEKTROKINETISK MIGRASJON	16
4.2.1 Påført elektrisk spenning.....	17
4.3 ORGANISK FASE - KUNSTIG VÆSKEMEMBRAN	18
5. EKSPERIMENTELT	20
5.1 MODELLANALYTTENE	20
5.2 UTSTYR OG BETINGELSER FOR ELEKTROMEMBRANEKSTRAKSJON	21
5.2.1 Elektromembranchipen	21
5.2.2 Elektromembranekstaksjon(EME).....	23
5.3 BETINGELSER FOR ANALYSEINSTRUMENTENE	24
5.3.1 Kapillærelektroforese (CE).....	24
5.3.2 Massespektrometri (MS).....	24
5.3.3 UV-deteksjon.....	25
5.4 KJEMIKALER.....	25
5.5 LØSNINGER.....	26
5.5.1 Stam- og prøveløsninger	26

5.5.2	<i>Mikrosomal inkubasjon av amitriptylin</i>	26
5.6	BEREGNING AV UTBYTTE, OPPKONSENTRERINGSFAKTOR OG HALVERINGSTID	27
5.6.1	<i>Utbytte</i>	27
5.6.2	<i>Oppkonsentreringsfaktor</i>	27
5.6.3	<i>Beregning av halveringstid</i>	28
6.	RESULTATER OG DISKUSJON	29
6.1	ON-CHIP EME – ENKELTFLOW MED AKSEPTORRESERVOAR	29
6.1.1	<i>Ulik spenning</i>	30
6.1.2	<i>Oppkonsentrering</i>	31
6.1.3	<i>Ekstraksjon av urinprøver</i>	32
6.2	ON-CHIP EME – DOBBELTFLOW OG OFFLINE-DETEKSJON	34
6.2.1	<i>Effekt av ulik flowhastighet</i>	34
6.2.2	<i>Effekt av ulik organisk fase</i>	36
6.2.3	<i>Alternative bakgrunnsanalytter</i>	38
6.2.4	<i>Strømstabilitet</i>	39
6.3	ON-CHIP EME - ONLINE UV-DETEKSJON	40
6.3.1	<i>Gradientkonsentrasjon</i>	40
6.3.2	<i>Variasjon av ulik spenning</i>	42
6.3.3	<i>Oppkonsentreing</i>	47
6.4	ON-CHIP EME – ONLINE MS-DETEKSJON	48
6.4.1	<i>Ekstraksjon av urinprøver</i>	48
6.4.2	<i>Metabolisme av amitriptylin</i>	49

7.	KONKLUSJON	54
8.	KILDELISTE.....	56

1. Sammendrag

I dette prosjekt er det for første gang utført elektromembranekstraksjon (EME) med et flowsystem i et chipformat.

I den mest omfattende delen av prosjektet, besto EME-chipen av en 50 μm dyp kanal på hver side av en 25 μm tykk kunstig væskemembran dannet av en porøs polypropylen membran tilsatt det organiske løsemiddelet NPOE. Både donorfasen og akseptorfasen ble pumpet i en konstant flow i EME-chipens kanaler på hver side av membranen der elektromembranekstraksjonen foregikk. I en mindre del av prosjektet ble det benyttet chips der akseptorfasen var stillestående i et reservoar på 7,0 μL .

De basiske legemidlene petidin, nortriptylin, metadon, haloperidol og loperamid ble effektivt elektromembranekstrahert med ekstraksjonsutbytter på 50-90%. EME-systemet ble operert med en spenning på 15V, den positive elektroden var plassert i donorfasen og den negative elektroden i akseptorfasen. Da det var viktig at modellanalyttene var ladet under hele ekstraksjonsprosessen, ble 10mM HCl benyttet som bakgrunnsanalytt i de fleste forsøkene der det ble utført offline-analyse etter EME på kapillær elektroforese.

EME-systemet ble testet ut med ulike betingelser: flowhastigheter, spenninger, og ulike organiske løsemidler. Systemet fungerte også svært godt med maursyre som bakgrunnsanalytt med ekstraksjonsutbytter på 77-92 %, og det ble vist at det kunne oppnås oppkonsentreringsfaktorer på opptil 107.

Ved å koble on-chip EME til online UV- eller MS-analyse, ble det mulig å overvåke konsentrasjonssvingninger i donorfasen underveis i EME-prosessen. Det ble blant annet illustrert ved EME av urinprøver, og EME av legemiddelet amitriptylin under metabolisme av rottemikrosomer, der akseptorfasen ble ledet direkte til MS-analyse.

Slik ble det vist at on-chip EME har et stort potensial som en rask og effektiv prøveopparbeidelsesmetode med muligheten for påfølgende online-analyse.

2. Forkortelser

μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
CE	Kapillærelektroforese
cm	Centimeter
DEHP	di(etylheksyl)fosfat
EME	Elektromembranekstraksjon
ESI-MS	Elektrosprayionisasjon – massespektrometri
EF	Oppkonsentreringsfaktor
GC	Gasskromatografi
HCl	Saltsyre
HCOOH	Maursyre
HPLC	Væskeskromatografi
i.d	Indre diameter
kV	Kapillærelektroforese
LLE	Væske-væske-ekstraksjon (Liquid-Liquid Extraction)
LPME	Væskefase mikroekstraksjon (Liquid Phase Micro Extraction)
M	Molar
mAU	Mikroabsorbansenheter
MeOH	Metanol
mg	Milligram
MgCl_2	Magnesiumklorid
min	Minutter
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
nm	Nanometer
MS	Massespektrometri
ms	Millisekund
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenfosfat

NaOH	Natriumhydroksid
NPOE	2-nitrofenyloktyleter
o.d	ytre diameter (Outer diameter)
PMMA	Polymetylmetakrylat
R	Utbytte (Recovery)
RSD	Relativt standardavvik
SLM	Kunstig væskemembran (Supported Liquid Membrane)
SPE	Fast-fase-ekstraksjon (Solid-Phase Extraction)
UV	Ultrafiolett
V	Volt
v/v	Volumprosent

3. Introduksjon

Ved kjemisk analyse av legemidler i farmasøytiske preparater eller i biologiske væsker som blod og urin, er prøveopparbeidelse en svært viktig del av analysearbeidet. Hensikten er å fjerne forurensninger fra prøvematriks eller isolere analyttene fra resten av prøven fordi forurensninger ofte kan gi uønsket respons på analyseapparatene eller fordi forurensningene ikke er kompatible med analyseapparatene og dermed kan ødelegge dem. I tillegg kan det å oppkonsentrere stoffer være nødvendig hvis analyttene er til stede i svært lav konsentrasjon. For å isolere analyttene fra prøvematriks kan ulike ekstraksjonsteknikker benyttes. Væske-væske-ekstraksjon (LLE) og fast-fase-ekstraksjon (SPE) er to teknikker som er mye brukt og er de vanligste prøveopparbeidelsesmetodene ved analyse av legemidler i biologisk matriks [1].

Fordeler med LLE er at prosedyren er lett å standardisere og løsemidlene som ofte benyttes, er lett tilgjengelige. Men LLE har også noen ulemper, for eksempel at forbruket av løsemidler er høyt og at disse kan være toksiske, samt at metoden er vanskelig å automatisere [1]. Disse ulempene har blant annet vært grunnlaget for videre forskning. Etter hvert har det også blitt et økt fokus på å lage gode metoder i mikroskala, fordi man ofte har lite prøve til rådighet, f. eks kun en bloddråpe. Det er samtidig ønskelig at metodene bør være raske og kostnadseffektive, og ikke minst å oppnå god isolering og oppkonsentrering av analyttene [2]. Nyere og videre forskning har gitt opphav til nye teknikker basert på LLE, blant annet single-drop microextraction, LPME (liquid-phase microextraction) med porøse fibere der organiske væsker danner en kunstig væskemembran, og enda nyere elektromembranekstraksjon (EME) [3].

LLE består av to ulike faser, en organisk fase og en vandig fase som ikke er blandbare med hverandre. Prinsippet er basert på at analyttene, som en ønsker å isolere fra

resten av prøvematriks, vil fordele seg inn i den organiske fasen der de vil være mest løselige, mens resten av prøven forblir i den vandige fasen [1].

På midten av 1980-tallet presenterte Audunsson [4] prinsippet der man tilsatte en organisk væske til et porøst hulfibermaterial som dannet en væskemembran. Den organiske væsken fungerte da som en membran som kunne skille to vandige faser fra hverandre på hver side av membranen. Den ene vandige fasen var en donorfase som inneholdt analyttene og ble ledet i ett flowsystem forbi væskemembranen og analyttene ble ekstrahert gjennom den organiske væskemembranen og inn i en vandig stillestående akseptorløsning. Væskemembraner i ekstraksjonssystemer ble utviklet videre og kalt SLM-systemer (supported liquid membrane). Disse systemene gir god oppkonsentrering av analyttene fordi volum av akseptorløsningen er mye mindre enn volum av donorløsning [5-7].

LPME ble for første gang introdusert i 1996, og var da basert på en dråpe av organisk løsemiddel som hang på enden av en teflonstang. Teflonstangen ble videre plassert ned i en vandig donorfase, og analyttene i donorfasen ble ekstrahert inn i dråpen av organisk løsemiddel. Året etter ble denne metoden forbedret slik at den organiske løsemiddeldråpen hang på enden av en sprøyte. Det ble tilsatt en magnetrører, og stoffene ble ekstrahert ved passiv diffusjon. Etter ekstraksjonen ble dråpen trukket tilbake inn i sprøyten og ekstraktet ble injisert på kapillær gasskromatograf. Selv om dette var hensiktsmessig, ble det også sett ulemper ved at den hengende dråpen var ustabil og lett kunne løsne i påvirkning av risting fra magnetrører, som var nødvendig for å øke ekstraksjonshastigheten [8-11].

Dette førte blant annet til at SLM-systemene ble utviklet videre og Pedersen-Bjergaard og Rasmussen [12] viste for første gang et alternativt system for LPME, der den organiske væsken var immobilisert i en porøs polypropylen hul fiber, brukt i et mikrosystem, med billig og enkelt engangsutstyr. Det ble da mulig å blant annet ekstrahere flere ekstraksjonseenheter (5-20 prøver) parallelt, samt at det ikke ble noen risiko for carry-over effekt da alt utstyr inkludert polypropylen fiberen kun ble brukt

èn gang. Hver ekstraksjonsenhet besto av en 4mL vial med skrutopp av silikon som inneholdt den vandige donorløsningen. To 0,8mm sprøyter ble stukket gjennom silikonløkket og den porøse hule fiberen av polypropylen var festet på enden av nålene. Et organisk løsemiddel ble tilsatt og immobilisert i den porøse fiberen og dannet da den kunstlige væskemembranen, SLM, i ekstraksjonssystemet. Den ene sprøytespissen ble brukt til å innføre den vandige akseptorfasen til fiberens hulrom, mens den andre sprøytespissen ble brukt til å samle opp akseptorfasen etter ekstraksjonen. I bunnen av vialen ble det plassert en magnetrører som sørget for bevegelse i løsningen under ekstraksjonen. Metamfetamin, som er en basisk forbindelse, ble brukt som modellanalytt og donorløsningen ble justert med NaOH slik at metamfetamin var uionisert i denne fasen, mens akseptorløsningen ble gjort sur med HCl. Analyttmolekylene ble effektivt ekstrahert via passiv diffusjon fra donorløsningen, gjennom den kunstige organiske væskemembranen, til akseptorløsningen der de ble ionisert. Det at stoffene ble ionisert i akseptorløsningen, førte til at de ikke ble tilbakeekstrahert, men fanget i akseptorløsningen. Dette gav god prøveopprensing, da store molekyler som proteiner var uløselige i den immobiliserte organiske membranen og forble i donorløsningen. Sure og nøytrale stoffer ble heller ikke ekstrahert over membranen fordi de sure stoffene ble ladet i donorløsningen, mens polare nøytrale stoffer var uløselige i den organiske membranen.

LPME kan utarte seg som et tofasesystem eller et trefasesystem alt etter hva som er mest fordelaktig å anvende i forhold til hvilket analyseapparat som skal benyttes. Prinsippene for dette ble blant annet vist av K.E Rasmussen mfl [13]. For LPME kombinert med GC ble det benyttet et tofasesystem der donorfasen i systemet var vandig, mens akseptorfasen som analyttene ble ekstrahert over i, var en organisk fase som analyttene hadde god løselighet i. Det organiske løsemiddelet var også kompatibel med GC- instrumentet og kunne dermed injiseres direkte etter ekstraksjon. Ved LPME i kombinasjon med CE og HPLC var det også ønskelig å ha en akseptorfase som kunne føres direkte til analyseapparatet etter ekstraksjonen, og et

trefasesystem ble benyttet. Analyttene ble da ekstrahert fra en vandig fase, gjennom en organisk fase og videre inn i en vandig akseptorfase. Det var i disse tilfellene fordelaktig med en vandig akseptorfase fordi man i et vanlig CE-instrument ikke kan injisere organiske løsemidler, mens man i HPLC-systemet med omvendt-fase-kolonne, ikke ønsker å injisere organiske løsemidler med høyere elueringsstyrke enn den mobile fasen som benyttes.

I 2005 ble et nytt konsept innen LPME introdusert, elektromembranekstraksjon(EME) [14]. I dette systemet ble analyttene ekstrahert over en kunstig organisk væskemembran i et trefasesystem drevet av elektrisk spenning. Analyttene i donorløsningen var ladet og det forkom en elektrokinetisk migrasjon av de ladede stoffene fra donorløsningen hvor anoden var plassert, over membranen og inn i akseptorløsningen hvor katoden var plassert. Elektrodene ble påført en spenning på 300 V og ekstraksjonen ble utført i 5 minutter under påvirkning av risting. Dette ga en raskere ekstraksjonsprosess enn ved normal LPME der ekstraksjonen i hovedsak er drevet av passiv diffusjon med pH-gradient [15].

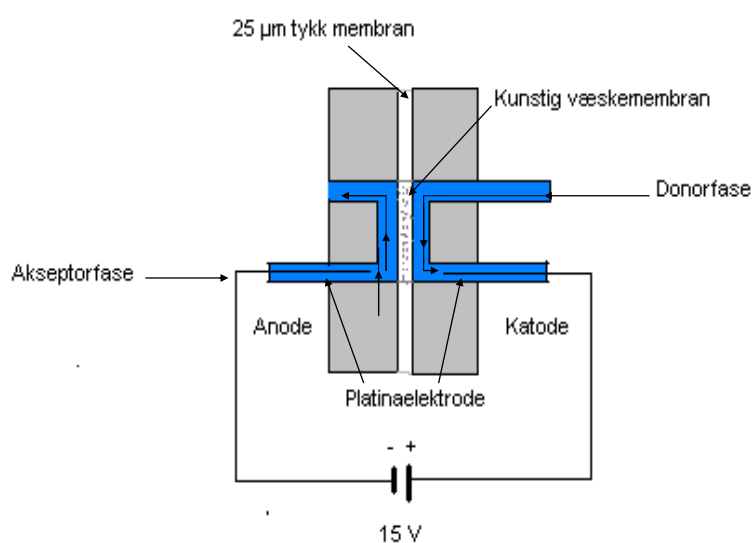
De siste årene har forskningen rundt elektromembranekstraksjon fortsatt og videre arbeid er gjort for å undersøke ulike parametere som påvirker ekstraksjonen og optimalisering av disse. Det er blant annet vist at sammensetningen og egenskapene til den organiske fasen som danner den kunstige væskemembranen, har stor betydning for utbytte av ekstraksjonsprosessen alt etter om analyttene man ønsker å ekstrahere er polare eller upolare forbindelser [16]. Videre er det vist at ekstraksjonsprosessen fungerer ved lavere spenninger [17], og helt nylig er det også vist at EME- systemet kan ekstrahere og isolere peptider fra plasma [18]. Det er vist god isolering av analyttene på relativt korte tidsintervaller i forhold til tradisjonell LPME. Dette er med på å vise at EME har et lovende potensial til å bli en implementert analysemetode i analytisk kjemi. Som nevnt innledningsvis er det stadig økt fokus på mikrosystemer innen analyse, og i 2009 viste Petersen mfl. [19] EME i et mikrosystem der både donorfasen og akseptorfasen består av kun en dråpe med en flat

kunstig væskemembran i mellom. Nytt med dette oppsettet var også at hele systemet var stillestående i forhold til tidligere arbeid med EME-systemer der systemene var påvirket av risting av vibrasjonsmikser.

I denne oppgaven ble fem basiske modellanalytter for første gang prøvd ut i et EME-mikrosystem i et chipformat. Den kunstige væskemembranen var plassert i chipen og de vandige fasene ble ført til den kunstige væskemembranen via kanaler i chipen. Mens tidligere arbeider med EME har benyttet magnetrører for å skape bevegelse i systemet, er det i denne oppgaven arbeidet med et EME-system der donor- og akseptor-fase ble ført til væskemembranen i chipen i en væskestrøm. En liten del av oppgaven omhandler et chipsystem der donarløsningen var i konstant flow, mens akseptorløsningen var stillestående. I resten av oppgaven ble det laget et system der både donor- og akseptorløsningen ble ført til chipen med flow. Ulike parametere som spenning, flowhastighet, forskjellige væskemembraner ble prøvd ut for å kunne optimalisere systemet. Videre ble systemet koblet opp for online-måling av analytter etter EME til UV-deteksjon og senere også til MS-deteksjon. Sistnevnte system ble prøvd ut i et metabolismeforsøk, der stoffet amytriptylin og dannelse av dens metabolitter under metabolisme av mikrosomer fra rottelever, ble målt online under hele metabolismereaksjonen.

4. Teori

4.1 Prinsipp for elektromembranekstraksjon



Figur 1. Skjematisk figur av EME-oppsettet

Elektromembranekstraksjon er et trefasesystem. Analyttstoffene blir ekstrahert fra en vandig donorfase, over en kunstig væskemembran bestående av en organisk væske immobilisert i porene til en porøs hul fiber, og videre inn i en vandig akseptorfase. Det blir lagt på elektrisk spenning og det er det elektriske potensialet som fører til at stoffene migrerer over membranen. Hele EME-systemet må derfor fungere som en elektrisk krets, der hver fase i systemet må ha evne til å lede strøm. De vandige fasene inneholder mange ioner, analyttioner og bakgrunnsioner, og vil følgelig kunne lede strøm godt. Den kunstige væskemembranen utgjør resistans i systemet, og den organiske fasen som danner membranen, må ha en viss polar karakter for å kunne lede strøm [14]. Elektrodene blir plassert på hver sin side av den kunstige

væskemembranen, i henholdsvis donorløsningen og akseptorløsningen. På hvilken side av membranen katoden og anoden plasseres, kommer an på analyttenes ladning. Det vil være slik at analyttene, som må være på ionisert form, vil migrere mot elektroden med motsatt ladning. Dette gjør at systemet kan ekstrahere legemidler med ulike kjemiske egenskaper, ved å forandre på oppsettet av systemet.

4.2 Elektrokinetisk migrasjon

Migrasjon av analyttene i de ulike fasene i et normalt LPME-system, blir drevet av passiv diffusjon med pH-gradient ved at analyttene har en høyere fordelingskoeffisient i akseptorfasen enn i donorfasen [20]. I tilfeller der analyttene er basiske, blir den vandige donorfasen pH-justert med f. eks NaOH, slik at analyttene blir uionisert i donorfasen. Hvis systemet er et trefasesystem, blir den vandige akseptorfasen gjort sur, slik at de basiske analyttene vil bli protonert når de kommer over i denne fasen og er dermed mindre løselig i donorfasen enn akseptorfasen. Hvis systemet er et tofasesystem vil analyttene ekstraheres over i akseptorfasen som da er en organisk fase, fordi analyttene vil være bedre løselig i denne fasen.

I elektromembranekstraksjon er analyttene derimot på ionisert form under hele ekstraksjonen. Ved ekstraksjon av basiske stoffer blir derfor både donor- og akseptorfasen pH-justert, typisk med HCl, slik at begge fasene får lav pH. Den positive elektroden blir plassert i donorløsningen, mens den negative elektroden blir plassert i akseptorløsningen. På grunn av den lave pH verdien, vil de basiske analyttene få positiv ladning i begge fasene og migrere fra den positive elektroden mot den negative elektroden.

EME-systemet kan også benyttes til å ekstrahere sure substanser. Oppsettet blir da motsatt ved at den positive elektroden blir plassert i donorløsningen, og både akseptor- og donorfasen blir gjort basisk. Analyttene som da vil være negativt ladet, vil migrere mot den positive elektroden i akseptorløsningen [21].

4.2.1 Påført elektrisk spenning

Fra arbeid med EME i et stillestående system [19] er det vist at den påsatte spenningen over membranen vil påvirke både elektrokinetisk transport av analyttene, samtidig som den vil modifisere fordelingen av analyttene inn og ut av membranen. Dette blir forklart ut ifra Nernst ligningen.

I følge Nernst ligningen er fordelingskoeffisienten ved grenseoverflaten mellom væskemembranen og donorløsningen avhengig av spenningspotensialet.

$$\Delta_0^w = \Phi^w - \Phi^0 = \Delta_0^w \Phi_i^{0''} + \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{c(0,t)_i^0}{c(0,t)_i^w} \quad \text{Ligning 1}$$

I denne ligningen er $\Delta_0^w \Phi$ den galvaniske spenningsforskjellen over grenseoverflaten mellom væskemembranen og donorløsningen, $c(0,t)_i^0$ er konsentrasjonen av analyttionet i væskemembranens grenseoverflate ved tiden t , $c(0,t)_i^w$ er analyttkonsentrasjonen i donorløsningens grenseoverflate, z_i er analyttionets ladning, R er gasskonstanten, F er Faradays konstant, T er absolutt temperatur, $\Delta_0^w \Phi_i^{0''}$ er en standard som er avhengig av standard fordelingskoeffisienten til analyttionet. Det vil være en tilsvarende spenningsavhengighet på hver side av membranen, men den påførte spenningen vil ha motsatt fortegn på hver side. Nernst ligningen kan bli skrevet om til å uttrykke fordelingskoeffisienten fra spenningsforskjellene ved overflaten, fordi den makroskopiske fordelingskoeffisienten til analytten i , P_i , kan antas å være lik overflatefordelingskoeffisienten ved antatt likevekt ved overflaten. Ved analytt-væskemembran grenseoverflaten fås ligningen:

$$P_i = \frac{c(0,t)_i^0}{c(0,t)_i^w} = \exp \left[\frac{ziF}{RT} \left(\Delta_0^w \Phi - \Delta_0^w \Phi^{0'} \right) \right] \quad \text{Ligning 2}$$

Et påsatt spenningspotensial som øker analyttens fordeling inn i væskemembranen fra donorsiden, vil også fremme analyttens fordeling fra membranen til akseptorfase og dermed øke transport over membranen som følge av donor-/væskemembran/akseptor-fase oppsettet.

Ved en viss påført spenning vil ikke fordelingskoeffisienten til analytten lenger være det begrensende trinnet i ekstraksjonsprosessen. Den vil da i hovedsak være begrenset av analyttens diffusjon i donorløsningen mot membranen [19] .

4.3 Organisk fase - Kunstig væskemembran

Riktig valg av organisk fase er viktig av flere årsaker. Samtidig som den organiske fasen ikke kan være blandbar med vandige væsker og at den må kunne immobiliseres i hulrommene i den porøse fiberen som benyttes, er det i tillegg andre aspekter som må vurderes.

Ved elektrodene i både donorløsningen og akseptorløsningen vil følgende elektrolysereaksjoner oppstå ved elektrodene:

Donorløsning (ved anoden): $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + \frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{e}^-$

Akseptorløsning (ved katoden): $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$

Dette viser at oksyngass og hydrogengass blir dannet ved de to elektrodene. Dannelse av gassboblene vil øke ved økt strømflyt i systemet. Som nevnt i introduksjonen utgjør den kunstige væskemembranen den fasen i EME-systemet som er avgjørende for hvor godt systemet leder elektrisk strøm, og vil fungere som en motstand/resistans i systemet. For å redusere dannelsen av gassbobler, bør derfor ikke

den elektriske ledningsevnen til membranen være for høy, men være slik at man får en tilstrekkelig effektiv elektrokinetisk transport av analyttene over membranen samtidig som ikke gassbobledannelsen er for stor [14]. Gassdannelse kan skape problemer i systemet. Som følge av elektrolysen som skjer ved katoden, kan akspetorfasens pH påvirkes og bli mindre sur.

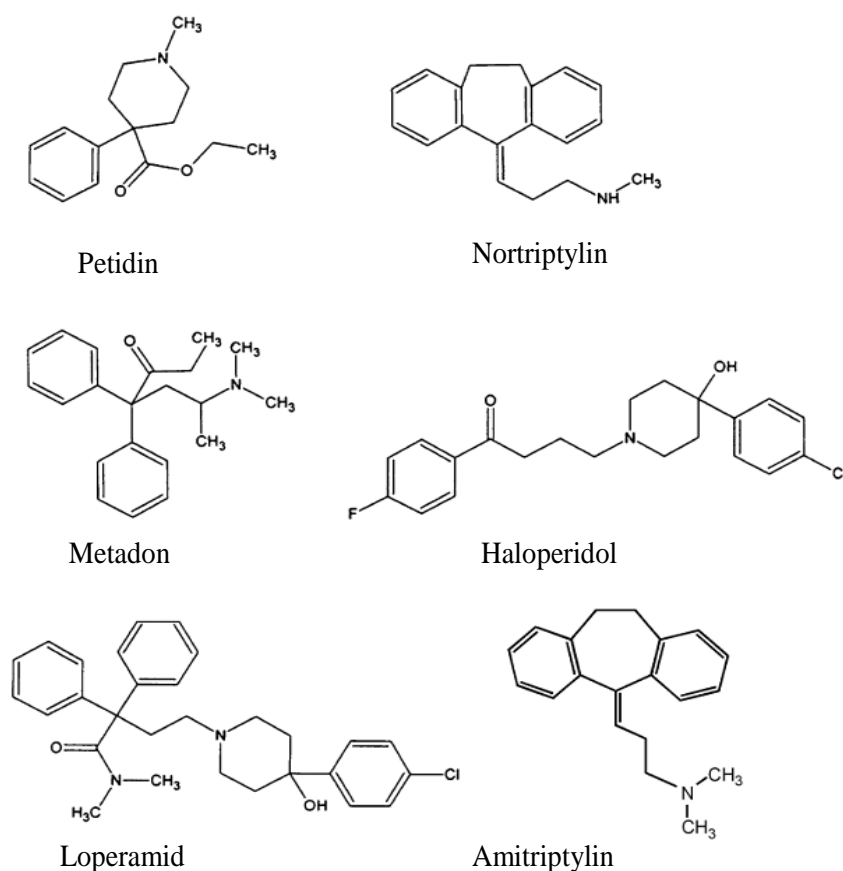
Valg av organisk løsemiddel er også svært viktig for systemets selektivitet. Dette er basert på analyttenes egenskaper. En vanlig forbindelse å bruke som den organiske fasen, er den organiske forbindelsen NPOE, denne er også blitt brukt under hele dette prosjektet. Upolare forbindelser med en høy fordelingskoeffisient ($\log P > 2$) synes å bli ekstrahert svært godt over membranen med denne organiske fasen, mens mer polare stoffer ikke vil bli ekstrahert over membranen i noe grad. Ved å tilsette f. eks DEHP, som er en ionepardanner, vil effektiviteten av elektrokinetisk migrasjon over membranen av mer polare stoffer øke. Følgelig kan man ved å tilsette ulike mengder av forskjellige løsemidler, lage den organiske væskemembranen slik at den enten kan ekstrahere over et vidt spekter av forbindelser av både polare og upolare legemidler ($\log P -1.3 - 5.7$), eller lage membranen slik at kun enkelte forbindelser vil bli ekstrahert over membranen [16].

5. Eksperimentelt

5.1 Modellanalyttene

I denne oppgaven ble det benyttet 6 modellanalytter. Petidin, nortriptylin, metadon, haloperidol og loperamid ble brukt som standard modellanalytter under de aller fleste forsøkene hvis ikke annet er nevnt. I forsøkene omtalt i kapittel 6.4.2, ble amitriptylin benyttet som modellanalytt.

I Figur 2 vises strukturformlene til modellanalyttene, og i Tabell 1 vises noen av deres fysikalskkjemiske egenskaper. Log P er substansens fordelingskoeffisient i n-oktanol/vann ved pH 7,4.



Figur 2. Strukturformler for modellanalyttene [14]

Tabell 1. Fysikalkjemiske egenskaper for modellanalyttene

Modellanalytt	Molekylvekt	Log P	pK _a
Amitriptylin	277,4	4,94	9,5
Petidin	247,3	2,7	8,7
Nortriptylin	263,4	1,7	9,7
Metadon	309,4	2,1	8,3
Haloperidol	375,9	3,2	8,3
Loperamid	477	5,2	8,7

*Opplysningene er hentet fra Clarke's Analysis of Drugs and Poisons
(3.utgave, Pharmaceutical Press, London, UK, 2004)*

5.2 Utstyr og betingelser for elektromembranekstraksjon

5.2.1 Elektromembranchipen

Elektromembranchipene som ble benyttet, hadde to ulike design.

For EME med dobbeltflow, som presentert i kapitlene 6.2-6.4, besto elektromembranchipen av to plater polymetylmetakrylat(PMMA) i dimensjonen 55mm*53mm*2,1mm. I hver plate ble det freset 5 separate 6mm lange kanaler med en dybde på 50 µm og en bredde på 2 mm, som ga ett volum av kanalen på 0,6 µL. I hver ende av kanalene ble det boret et hull med en diameter på 1,6 mm. Dette ble gjort ved hjelp av en CNC mikrofresermaskin (Folken M3400 E CNC mini mill, Folken Industries, Glendale, CA, USA). Det ble laget 5 separate kanaler i hver chip.

For elektromembranchipene som ble benyttet til EME med enkeltflow som presentert i kapittel 6.1, ble den ene av PMMA-platene laget som beskrevet over, mens i den andre platen ble det kun boret et hull på 2 mm som fungerte som akseptorreservoar.

Mellom de to PMMA-platene ble det plassert en 25 μm tykk porøs polypropylen membran med 55% porøsitet, og 0,21 μm * 0,05 μm porer (Celgard 2500 micro-porous membrane, Celgard, Charlotte, NC, USA). Platene ble festet via løsemiddelassistert binding med etanol og herdet i varmeovn på 70°C.



Figur 3. Elektromembranchip med 5 separate kanaler.

En platinaelektrode(0,076mm o.d.; Aldrich) var plassert både i akseptorreservoaret/akseptorkanalens og donorkanalens utgang, og var koblet til en spenningskilde (EL302T Triple power supply, Thurlby-Thandar Instruments LTD, Cams, UK). For å overvåke strømmen og for opptak av strømkurver, var et multimeter av typen Agilent U1253A (Agilent, Palo Alto, CA, USA) alltid tilkoblet systemet.

For å pumpe donorfase og akseptorfase til chipens kanaler, ble det benyttet sprøytepumper (KDS-100-CE, KD Scientific, Holliston, MA, USA) med gasstette sprøyter (#1001 Hamilton, Bonaduz, Sveits). I enkelte forsøk ble det benyttet en

HPLC-pumpe, en Shimadzu LC-10AD pumpe (Shimadzu, Kyoto, Japan). På sprøytenes ende satt teflon(PTFE)-slanger (1/16" o.d, 0,5mm i.d) som gikk til elektromembranchipens inngangshull i kanalene. Slangene passet til kanalens inngangshull, men det ble benyttet smeltelim fra limpistol for oppnå ett helt tett system uten lekkasjer. Underveis i arbeidet, ble den ene teflonslangen som ledet akseptorfasen til elektromembranchipen byttet ut med en metallkanyle med butt ende (Terumo Mixing needle whitout bevel, 1,2*40mm, terumo Europa N.V 3001 Leuven Belgia).

5.2.2 Elektromembranekstraksjon(EME)

Elektromembranekstraksjonen ble utført som vist på Figur 1

Før elektromembranekstraksjonen ble startet, ble tilsammen 0,4 µL NPOE tilsatt den porøse polypropylen membranen. Ved bruk av en 10µL effendorf mikropipette(Eppendorf,Hamburg,Tyskland) ble 0,2 µL NPOE tilsatt membranen via inngangshullet og utgangshullet i chipens akseptorkanal. NPOE fylte raskt membranens porer og ble immobilisert, noe som enkelt kunne observeres da NPOE gjorde membranen helt transparent i kontrast til dens hvite farge der NPOE ikke var tilsatt. Som følge av fargeforandringen ble det visuelt observert at NPOE ble vasket ut etter flere ekstraksjonsserier. Hvor mange ekstraksjonsserier som ble utført før ny NPOE ble tilsatt membranen, ble vurdert ut ifra hvor stor strømflyt det løp i systemet.

I forsøkene presentert i kapittel 6.1 On-chip EME – Enkeltflow med akseptorreservoar, ble kun 0,2 µL NPOE tilsatt membranen via akseptorfasens reservoar på elektromembranchipen.

Sprøytepumpene ble innstilt på ønsket flowhastighet for donorløsningen og akseptorløsningen. De ulike hastighetene er angitt for de ulike forsøkene.

I EME-systemet med enkeltflow, ble 7,0 µL 10mM HCl plassert i elektromembranchipens akseptorreservoar. Sprøytepumpen på donorsiden ble innstilt på ønsket flowhastighet.

Sprøytepumpene pumpet donorløsningen og akseptorløsningen gjennom de to kanalene på hver side membranen. Selve elektromembranekstraksjonen ble startet da spenningen ble satt på. På samme måte ble den stoppet etter ønsket ekstraksjonstid ved å skru av spenningen. Spenningskilden var operert på 15 V hvis ikke annet er angitt. Den positive elektroden var plassert på donorsiden, mens den negative elektroden var plassert på akseptorsiden.

I on-chip EME med offline-analyse ble akseptorfasen etter elektromembranekstraksjonen overført til en vial med mikropipetten og analysert på CE.

I on-chip EME med online-analyse ble akseptorfasen ledet direkte fra akseptorkanalens utgangshull via et kapillær til enten UV- eller MS-deteksjon

5.3 Betingelser for analyseinstrumentene

5.3.1 Kapillærelektroforese (CE)

Kapillærelektroforese (CE) ble utført med ett Agilent Technologies HP^{3D} CE-instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Tyskland) utstyrt med UV-detektor operert på 200 nm. Kapillæret var et 33cm langt fused-silika kapillær (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) med 75µm i.d og en effektiv lengde på 24,5cm. Bufferen som ble benyttet var 25mM natriumdihydrogenfosfat justert til pH 2,7 med o-fosforsyre. Instrumentet ble operert på 20kV.

5.3.2 Massespektrometri (MS)

MS-instrumentet som ble benyttet til online-analyse, var av typen Bruker-Esquire LC-MS ion trap, in house build ESI(electro spray interface). Betingelsene instrumentet ble operert under, er angitt i Tabell 2.

Tabell 2 Betingelser for MS-analysene

Ioniseringsmodus	ESI(positiv)
Forstøvergass	Nitrogen
Trykk på forstøvergass	50 psi
Tørkegass	Nitrogen
Hastighet på tørkegass	2,00 L/min
Temperatur på tørkegass	150 °C
Kapillærspenning	-4450V

MS-instrumentet utførte følgende scan: m/z :100 – 500, scanhastighet ;100ms

Kapillæret som ledet akseptorfasen fra EME-chipen til MS-instrumentet var et 50 μ m i.d kapillær (prdukt nr TSP050375, Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA)

5.3.3 UV-deteksjon

UV-detektoren som ble benyttet til online-analyse, samt kapillæret som ledet akseptorfasen til UV-detektoren fra EME-chipen, var det samme som omtalt i kapittel 5.3.1. Hvis ikke annet er nevnt, ble UV-detektoren operert på 200 nm.

5.4 Kjemikaler

Petidin hydroklorid, nortriptylin hydroklorid, metadon hydroklorid, haloperidol og loperamid hydroklorid og amitriptylin hydroklorid kom alle fra Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA).

2-Nitrofenyloktyleter(NPOE), 2-Nitrofenylpentyleter, 2,4-Dimetyl-1-nitrobenzen, 1-Etyl-2-nitrobenzen og fenyltrimetylammonium kom fra Fluka(Buchs, Sveits)

5.5 Løsninger

5.5.1 Stam- og prøveløsninger

Stamløsninger på 1mg/mL av petidin, nortriptylin, metadon, haloperidol og loperamid i 10% (v/v) i etanol oppbevart ved 4 °C og beskyttet fra lys ble benyttet. Fra disse stamløsningene ble det laget fortynnete prøveløsninger med enten 10mM HCl, 100mM HCOOH, 50mM NaH₂PO₄, 50%(v/v) 10mM HCl/humant urin eller 50%(v/v) 100mM HCOOH/humant urin.

Fenyltrimetylammonium som ble benyttet som intern standard i enkelte forsøk, var fortynnet med 10mM HCl i en konsentrasjon på 20 µg/mL.

Humant urin som ble benyttet til de biologiske prøveløsningene, kom fra frivillige personer ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi, Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet.

5.5.2 Mikrosomal inkubasjon av amitriptylin

Følgende løsninger i angitt konsentrasjon ble benyttet til å tilberede inkubasjonen av amitriptylin.

- a) MgCl₂ 100mM
- b) Kaliumfosfatbuffer pH 7,4 1,0M
- c) Amitriptylin 5mM løst i MeOH/H₂O (Den totale konsentrasjonen av organisk løsemiddel skulle ikke overstige 1 % av inkubasjonsløsningen)
- d) Mikrosomer fra rottelever (RLM 20mg/mL, Rat liver microsomes 0.5 mL lagret ved -80°C, BD Gene test (trade mark), cat nr 452501.
- e) NADPH 10mM i H₂O

De ulike løsningene ble blandet og tilsatt H₂O for å oppnå et totalt volum på enten 1mL eller 10 mL, og slik at sluttkonsentrasjonene i denne inkubasjonsløsningen ble: 5mM MgCl₂, 100mM Kaliumfosfatbuffer pH 7,4, 50 µM amitriptylin, 1mg/mL RLM, 1mM NADPH .

Løsningene a-d ble først blandet og ble plassert på vannbad (37 °C) i 5 minutter. NADPH (løsning e) ble tilsatt løsningen til slutt og startet inkubasjonen.

5.6 Beregning av utbytte, oppkonsentreringsfaktor og halveringstid

5.6.1 Utbytte

Utbytte, R, for modellanalyttene etter elektromembranekstraksjonen ble beregnet etter følgende ligning:

$$R = \left(\frac{n_{akseptor}}{n_{donor}} \right) * 100\% = \left(\frac{V_{akseptor}}{V_{donor}} \right) * \left(\frac{C_{akseptor}}{C_{donor}} \right) * 100\% \quad \text{Ligning 3}$$

I denne formelen er n antall mol modellanalytt i henholdsvis donorfasen før ekstraksjon og i akseptorfasen etter ekstraksjon. V_{akseptor} og V_{donor} er akseptorfasens og donorfasens volum og C_{akseptor} og C_{donor} er konsentrasjonen av modellanalyttene i de to fasene.

5.6.2 Oppkonsentreringsfaktor

Oppkonsentreringsfaktoren (EF) som oppnås for modellanalyttene etter endt elektromembranekstraksjon ble beregnet etter denne formelen:

$$EF = \frac{C_{akseptor}}{C_{donor}} = R * \frac{V_{donor}}{V_{akseptor}} \quad \text{Ligning 4}$$

5.6.3 Beregning av halveringstid

Ved å ta utgangspunkt i at et legemiddel har 1.ordens kinetikk, kan legemiddelets kinetikk beskrives via eksponentialligningen:

$$\frac{C_t}{C_0} = \exp(-k_e t) \quad \text{Ligning 5}$$

der C_t er konsentrasjonen av utgangsstoffet ved tiden t , mens C_0 er startkonsentrasjonen, k_e er eliminasjons hastighetkonstanten. $\frac{C_t}{C_0} = R$, den relative konsentrasjonen ved tiden t .

$\ln R = -k_e t$ og dermed blir $k_e = \frac{-\ln R}{t}$. Derfor blir k_e den rette linjens stigningstall ved lineær regresjon.

Halveringstiden kan beregnes ved at halveringstiden, $t_{1/2}$, er tiden da $R = 0,5$, dette gir:

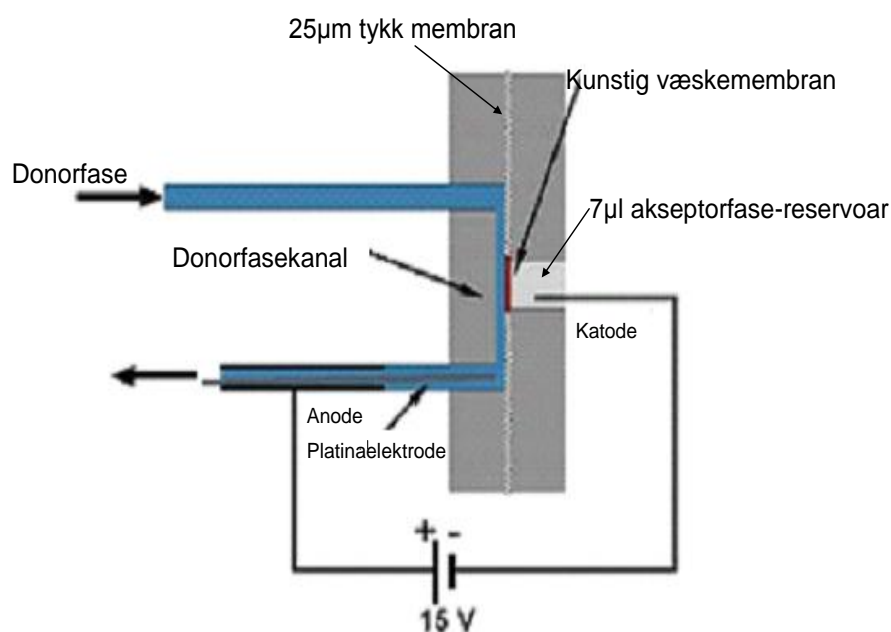
$$t = \frac{-\ln R}{k_e} \rightarrow t_{1/2} = \frac{-(\ln 0,5)}{k_e} \rightarrow t_{1/2} = \frac{0,693}{k_e}$$

Ligningen er hentet fra: Drug metabolism in drug design and development: basic concepts and practice[22]

6. Resultater og diskusjon

6.1 On-chip EME – Enkeltflow med akseptorreservoar

On-chip EME-oppsettet som ble brukt under disse forsøkene er vist i Figur 4. Donorfasen, spiket med petidin, nortriptylin, metadon, haloperidol og loperamid i en konsentrasjon på 10 µg/mL i 10mM HCl, ble ført til elektromembranchipens donorkanal i en jevn væskestrøm, der den kunstige organiske væskemembranen bestående av NPOE var plassert. Modellanalyttene ble ekstrahert over membranen og inn i et reservoar med 7,0 µL 10mM HCl stillestående akseptorløsning



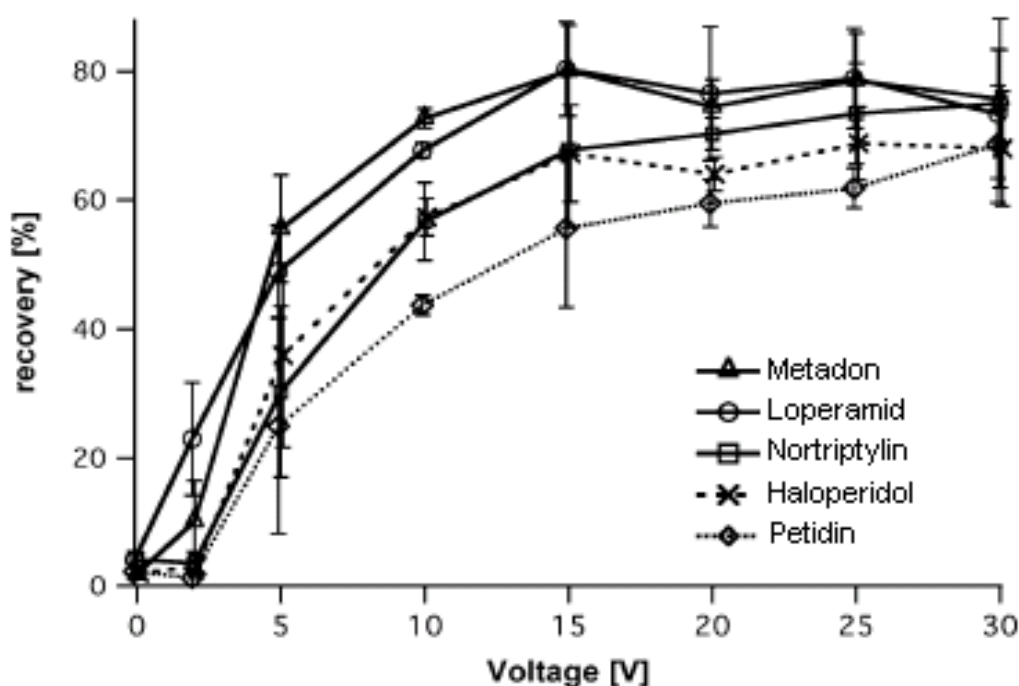
Figur 4 Skjematisk figur av EME-oppsettet med enkeltflow

Dette var et helt nytt oppsett for utførelse av elektromembranekstraksjon. Det hadde vært under utprøving en liten periode, og en del optimalisering av ulike parametere

var gjort. Likevel gjensto det noe arbeid som er beskrevet under i kapitlene 6.1.1-6.1.3, og som i tillegg kan leses om i den nylig publiserte artikkelen basert på arbeidet gjort med dette on-chip EME oppsettet [23]

6.1.1 Ulik spenning

I kapittel 4.2.1 er det beskrevet hvordan den påførte spenningen over membranen vil påvirke stoffenes fordeling inn og ut av membranen gitt av Ligning 2 side 18. For å undersøke dette, ble EME-oppsettet testet ut med ulike spenninger fra 0-30 V med en ekstraksjonstid på 5 minutter. Donorfasens flowhastighet var på 2,5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Figur 5 viser stoffenes ekstraksjonsutbytte plottet som funksjon av påført spenning over membranen. Som tidligere arbeid med EME også har vist [17, 19], øker ekstraksjonsutbytte med økt påsatt spenning inntil ett visst nivå, før stigningen avtar og inntar ett jevnt platå. Da den påførte spenning ble økt til 10-15V økte ekstraksjonsbyttet, mens det ikke ble oppnådd høyere ekstraksjonsutbytte ved å øke spenningen ytterligere. Årsaken til at utbytteverdiene ikke stiger ytterligere er fordi det ikke lenger vil være spenningen som er det begrensende trinnet i selve ekstraksjonsprosessen, men den vil være begrenset av stoffenes diffusjon i donorløsningen frem mot den kunstige væskemembranen [19]. Resultatet samsvarer med tidligere beskrevet teori angående den påførte spenningen over den kunstige væskemembranen, og kan dermed antas å gjelde for dette nye on-chip EME-oppsettet. På bakgrunn av dette ble det valgt å operere EME-systemet på en spenning på 15V.



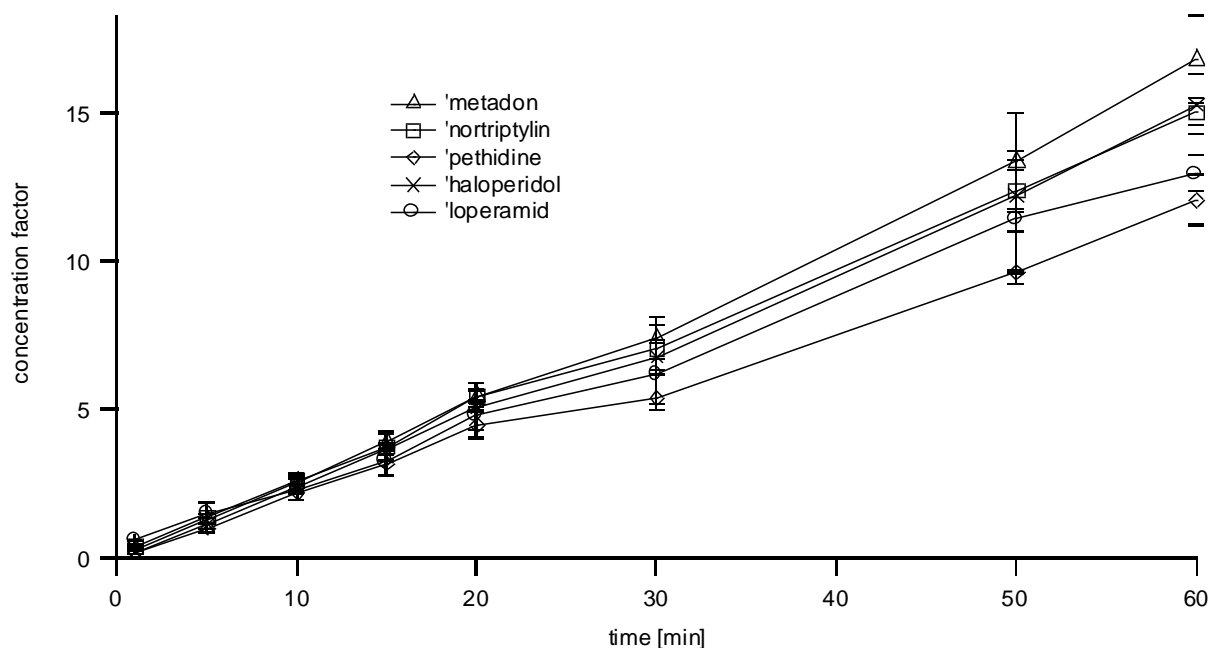
Figur 5. Utbytte som funksjon av spenning. Donorfasen: 10mM HCl med 10µg/mL av modellanalyttene, flowhastighet 2,5µL/min. Akseptorfase: 10mM HCl. Ekstraksjonstid: 5min

6.1.2 Oppkonsentrering

I en annen serie med forsøk ble det utført ekstraksjonsserier der ekstraksjonstiden varierte. Figur 6 viser resultatene der oppkonsentreringsfaktor er plottet som funksjon av ekstraksjonstid. Oppkonsentreringsfaktoren øker med lengre ekstraksjonstider i en lineær sammenheng. Dette kan forklares ut ifra Ligning 4 side 28, som viser at jo større volumforskjell det er mellom akseptorfasen og donorfasen, jo høyere oppkonsentrering av analyttene kan oppnås. Under disse forsøkene var donorfasens flowhastighet konstant på 2,5 µL/min noe som betyr at jo lenger ekstraksjonstiden var, jo større ble donorfasens totale volum som ble ført forbi den kunstige væskemembranen.

En mulig måte for å øke stigningen på grafen slik at oppkonsentreringsfaktorens verdi hadde steget raskere, ville vært å redusere akseptorfasens volum. Dette lot seg ikke gjøre med dette on-chip EME-oppsettet ettersom akseptorfasen ble samlet opp med en

pipette fra chipens reservoar for videre analyse på CE. I kapittel 6.3.3 blir det vist at det var mulig å oppnå en betydelig høyere oppkonsentrering når on-chip EME systemet ble operert med væskestrøm i både akseptorfasen og donorfase og ble koblet til online-analyse etter ekstraksjon.

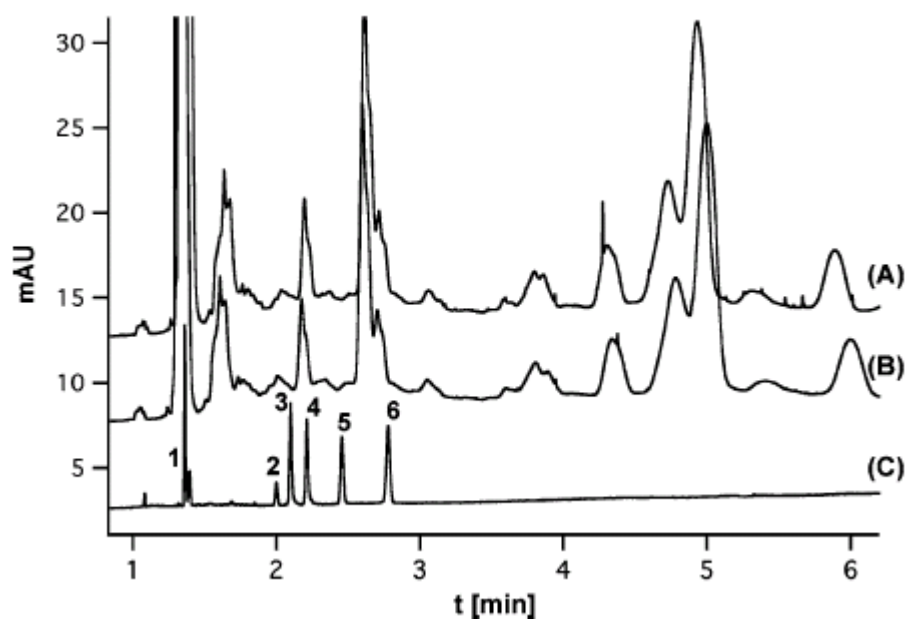


Figur 6. Oppkonsentreringsfaktor som funksjon av tid. Donorfase: 10mM HCl med 10µg/mL av modellanalyttene, flowhastighet; 2,5µL/min. Akseptorfase: 10mM HCl. Spenning; 15V.

6.1.3 Ekstraksjon av urinprøver

I de ulike forsøkene der forskjellige parametre ble testet ut i on-chip EME-oppsettet, besto donorfase av en vandig prøveløsning med 10mM HCl. Det var derfor interessant å teste ut EME-systemets evne til å rense opp i mer komplisert prøvematriks. Som følge av dette ble urinprøver spiket med en konsentrasjon på 1µg/mL av modellanalyttene, og ekstrahert på on-chip EME-systemet i 10 minutter. Figur 7 viser CE-analysen av denne prøven. For å vise den gode isoleringen som oppnås av de fem modellanalyttene etter elektromembranekstraksjonen, er det i tillegg vist analyseresultater av blank urin, samt urin spiket med samme konsentrasjon av modellanalyttene uten utført elektromembranekstraksjon. Resultatet tyder på at EME-

systemet effektivt kan isolere stoffer fra en biologisk matriks. Det er det ikke er mulig å detektere modellanalyttene i urinprøven som ikke er elektromembranekstrahert før CE-analysen, fordi disse er i en så lav konsentrasjon i forhold til andre stoffer(forurensinger) i urinprøven. I CE-analysen av urinprøven som er elektromembranekstrahert, detekteres kun modellanalyttene fordi andre forurensinger er fjernet fra prøven. Det er kun de basiske modellanalyttene som er blitt ekstrahert over den kunstige væskemembranen og inn i akseptorløsningen. Nøytrale forbindelser vil ikke ha en elektrokinetisk migrasjon eller eventuelt bli værende inni den kunstige væskemembranen, mens sure forbindelser ikke vil bli tiltrukket av den negative elektroden på akseptorsiden. Polare forbindelser vil ikke kunne passere den upolare væskemembranen.



Figur 7. (A) CE-analyse av blank urin, (B) CE-analyse av urin spiket med modellanalyttene uten utført EME før CE-analysen, (C) CE-analyse av urin spiket med modellanalyttene med 10 minutter on-chip EME før CE-analyse. De ulike toppene: 1=IS, 2=Petidin, 3=Nortriptylin, 4=Metadon, 5=Haloperidol, 6=Loperamid. Donorflow 2,5 μ L/min. Akseptorfase; 10mM HCl. Spenning; 15V

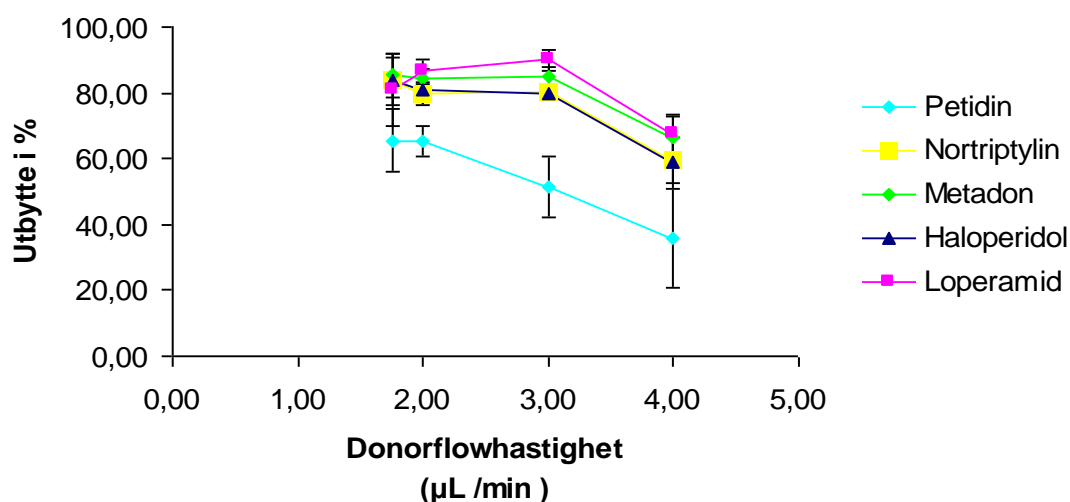
6.2 On-chip EME – Dobbelthflow og offline-deteksjon

I denne delen av oppgaven presenteres forsøk med elektromembranekstraksjon i chipformat, der både donorfasen og akseptorfasen ble ledet forbi den kunstige væskemembranen i en væskestrøm, som vist på Figur 1. Dette var første gang on-chip EME-formatet med væskestrøm på begge sider av membranen, dobbeltflow, ble prøvd ut. Ulike parametere var derfor interessante å undersøke nærmere for å kunne optimalisere systemet. Ved testing av de ulike parameterne, var ellers de andre betingelsene i on-chip EME-oppsettet de samme som beskrevet i kapittel 5.2 hvis ikke annet er angitt.

6.2.1 Effekt av ulik flowhastighet

Under arbeid med on-chip EME med flow kun i donorfasen, ble det sett at systemet gav høyere ekstraksjonsutbytte enn i ett EME-system der begge fasene var stillestående [19, 23]. Derfor var det naturlig å undersøke hva slags effekt det ville ha på EME-systemet å variere væskestrømmens flowhastighet for både donor- og akseptor-fasen i dette nye on-chip EME-formatet.

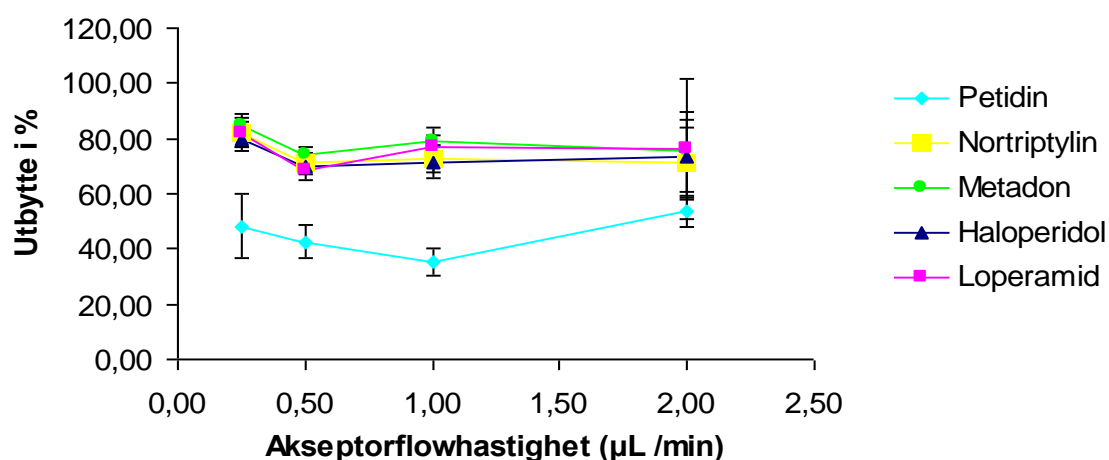
I ett sett med forsøk var det fokus på å variere donorfasens flowhastighet og denne ble variert i spennet fra 1,75 til 4,00 $\mu\text{L} / \text{min}$. Akseptorfasens flowhastighet var konstant på 1,00 $\mu\text{L} / \text{min}$ under alle disse forsøkene. De fem modellanalyttene var i en konsentrasjon på 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ og disse ble elektromembranekstrahert over den kunstige væskemembranen, og ekstraksjonsutbytte ble beregnet ved hjelp av Ligning 3 side 27. Ekstraksjonstiden var 7 minutter. Akseptorfasen ble på 7 μL og denne dråpen ble samlet opp fra kanalens utgang på chipen og analysert på CE.



Figur 8. Ekstraksjonsutbytte som funksjon av donarløsningens flowhastighet. Hvert punkt er basert på 5 paralleller. Donorfase: 10mM HCl med 10μg/mL av modellanalyttene. Akseptorfase; 10mM HCl, flowhastighet; 1μL/min. Spenning 15 V

Resultatene for ekstraksjonsutbyttet som funksjon av ulik flowhastighet på donorfasen er vist i Figur 8. Tendensen viser at det er fordelaktig med relativt lave flowhastigheter. Ekstraksjonsutbytte for alle stoffene ser ut til å falle da hastigheten ble økt til 4,00μL /min. Årsaken til dette er antageligvis at jo hurtigere donarløsningen passerer den kunstige væskemembranen i chipens kanal, jo kortere vil residenstiden bli for modellanalyttionene ved membranen. Det ser da ut til at systemet ikke like effektivt kan ekstrahere over modellanalyttionene til akseptorfase. Den samme tendensen er vist i det nylige publiserte arbeidet med on-chip EME [23].

Effekten av å variere akseptorfasens flowhastighet ble også testet. Akseptorfasens flowhastighet ble variert fra 0,25 til 2,00μL/min, mens donorfasens flowhastighet var konstant på 3,00μL/min. Denne hastigheten ble valgt fordi ekstraksjonsutbyttet syntes å ikke falle ved denne hastigheten (Figur 8), mens det samtidig var ønskelig å ha høyest mulig flowhastighet, slik at tiden for ekstraksjonsarbeidet ble så kort som mulig. De andre parameterne i systemet var ellers ikke forandret.



Figur 9. Ekstraksjonsutbytte som funksjon av akseptorløsningens flowhastighet. Hvert punkt er basert på 5 paralleller. Donorfase: 10mM HCl med 10μg/mL av modellanalytten, flowhastighet 3 μL/min. Akseptorfase; 10mM HCl. Spenning 15 V

Figur 9 viser at ekstraksjonsutbyttet for analyttene varierer lite ved de ulike hastighetene. Dette tyder på at effektiviteten til systemet ikke er like sårbar for variasjoner i akseptorfasens flowhastighet som i donorfases flowhastighet, og det vil være donorfases flowhastighet som er mest avgjørende for å oppnå et høyt ekstraksjonsutbytte for modellanalyttene. Dette kan trolig forklares ved at modellanalyttens residenstid i chipens kanal vil være lik under alle disse forsøkene fordi donorfases flowhastighet holdes konstant.

6.2.2 Effekt av ulik organisk fase

På grunnlag av erfaringene fra tidligere arbeid med det organiske løsemiddelet NPOE som den kunstige væskemembranen i EME, ble det valgt å benytte løsemiddelet også i dette prosjektet. EME-systemene har fungert godt og ga gode ekstraksjonsutbytter for de samme modellanalyttene som ble benyttet i dette arbeidet [14, 16, 19]. Likevel syntes det relevant å teste ut om andre organiske løsemidler kunne fungere som den

kunstige væskemembranen, da dette ikke var prøvd ut i dette EME-oppsettet før. Det var ønskelig å undersøke om systemet ble mer effektivt med tanke på selve ekstraksjonsprosessen, men også å undersøke om noen av forbindelsene kunne øke strømstabiliteten i systemet. Tre andre organiske løsemidler ble testet ut, 2-Nitrofenylpentyl eter, 2,4-Dimetyl-1-nitrobenzen og 1-Etyl-2-nitrobenzen. Disse ble prøvd ut som den kunstige væskemembranen i ulike ekstraksjonsserier, der 0,2µL*2 ble tilsatt membranen før hver ekstraksjonsserie.

Tabell 3 Ekstraksjonsutbytte i % for modellanalyttene med ulike organiske løsemidler brukt i den kunstige væskemembranen i on-chip EME-systemet. Donorfase: 10mM HCl med 10µg/mL av modellanalyttene flowhastighet; 3µL/min. Akseptorfase; 10mM HCl, flowhastighet; 1µL/min. Ekstraksjonstid; 10 min. Spenning 15 V

	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Loperamid
2-Nitrofenyloktyl eter	50	74	75	73	70
2-Nitrophenylpentyl eter	65	69	66	67	68
2,4-Dimetyl-1-nitrobenzen	55	92	63	59	63
1-Etyl-2-nitrobenzen	44	50	52	48	54

Som vist i Tabell 3 fungerte de tre andre organiske løsemidlene også godt som den kunstige væskemembranen, da alle gav relativt høyt og likt ekstraksjonsutbytte for analyttene. Det var ingen signifikant forskjell mellom utbyttene som ble oppnådd med de andre organiske fasene i forhold til NPOE. På bakgrunn av dette ble NPOE valgt til de videre forsøkene fordi denne allerede var blitt benyttet i arbeidet så langt med god erfaring.

Det ble også tatt opp strømkurver under alle ekstraksjonsforløpene for å undersøke om noen av de andre løsemidlene kunne bidra til en jevnere strømstabilitet i EME-systemet. Det så imidlertid ikke ut til at noen andre ga bedre resultater enn NPOE.

6.2.3 Alternative bakgrunnsanalytter

I arbeidet med å teste ut ulike parametere som kunne påvirke effektiviteten av EME-systemet og optimalisering av disse, ble 10mM HCl benyttet som bakgrunnsanalytt. Akseptorfasen besto kun av 10mM HCl, mens donorfasen besto av 10mM HCl spiket med de 5 modellanalyttene. HCl-løsningen hadde en viktig funksjon i systemet, fordi den sørget for lav pH slik at de basiske modellanalyttene forble på ladet form under hele ekstraksjonsprosessen. I tillegg ville ionene i HCl-løsningen fungere som bakgrunnsioner og førte til økt strømflyt i systemet. Denne effekten var mer uønsket fordi det etterstrebes så lav bakgrunnsstrøm som mulig.

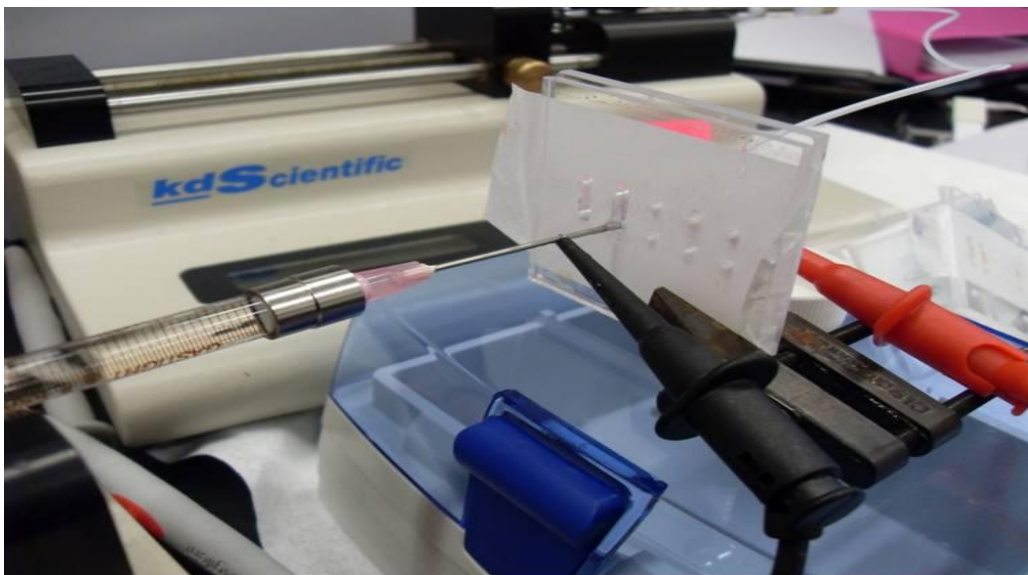
Hovedårsaken for å teste ut nye bakgrunnsanalytter, var å benytte en løsning i akseptorfasen som er kompatibel med massespektrometri (ESI- MS). Maursyre (HCOOH) er en flyktig forbindelse som er kompatibel med MS, og 10mM maursyre ble derfor testet ut som akseptorfase. pH i denne løsningen var litt høyere enn i 10mM HCl, men analyttene ville fortsatt være ionisert. Videre ble en 50mM natruimfosfatbuffer(NaH_2PO_4) innstilt med 1M NaOH til fysiologisk pH 7,4, benyttet som donorfase. I en serie med 5 paralleller, ble petidin, nortriptylin, metadon og haloperidol ekstrahert effektivt over den kunstige væskemembranen med ekstraksjonsutbytte på 77-92 %. Selv med nøytral pH i donorfasen ville analyttene være tilstrekkelig ionisert slik at de ville kunne migrere mot den negative elektroden. Akseptorfasens flowhastighet var på 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, mens donorfasens flowhastighet var på 3 $\mu\text{L}/\text{min}$, og spenningen var på 15 V i disse forsøkene

Det at utbytte forble like høye med disse bakgrunnsanalyttene, stemmer overens med nylig publisert arbeid [24] der det ble vist at forskjellene i både økt bakgrunnsstrøm og ekstraksjonsutbytte varierte relativt lite med ulike bakgrunnsanalytter.

6.2.4 Strømstabilitet

Et multimeter som målte strømmen under hver ekstraksjon var alltid tilkoblet EME-systemet, slik at man til en hver tid kunne følge med på strømmens utvikling i løpet av en ekstraksjon.

Det ble som tidligere beskrevet pålagt en spenning på 15 V under forsøkene. Likevel kunne strømmen i systemet variere, og enkelte tiltak ble prøvd ut med den hensikt å stabilisere og oppnå en jevnere strømflyt i systemet. Det førte til at den ene platinaelektroden på akseptorsiden av membranen ble byttet ut med en sprøytekanyle av metall. Den fungerte som elektrode samtidig som den førte akseptorfasen til EME-chipen fra sprøytepumpen. I tillegg ble det innført som en prosedyre å avgasse både akseptor- og donor- fasen 15 minutter med heliumgass daglig før de ble brukt i EME-systemet. Som beskrevet i kapittel 4.3, vil økt strømflyt i systemet føre til økt gassdannelse av hydrogengass og oksyngengass via elektrolyse ved elektrodene. Det å fjerne gass fra akseptor- og donor-fasen før ekstraksjonen, førte til at det ble mindre gassbobler totalt i systemet.



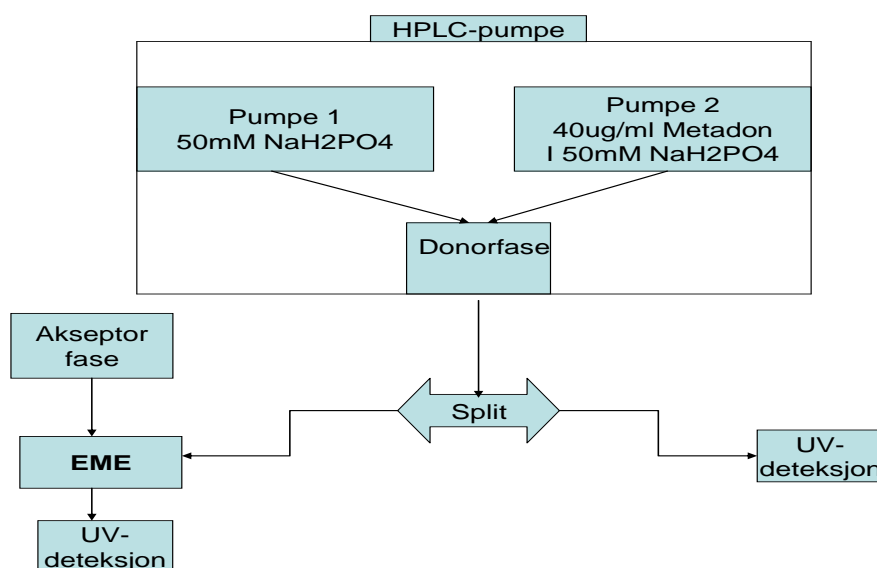
Figur 10. Sprøytekanyle av metall som fungerte som elektrode samtidig som den førte akseptorfasen fra sprøytepumpen fram til EME- chipens kanal.

6.3 On-chip EME - Online UV-deteksjon

En stor fordel med at akseptorfasen var i en flow i EME-systemet, var at det ble mulig å koble EME-systemet til online-analyse for å måle ekstraksjon av analytter. Derfor ble EME-systemet tilkoblet en UV-detektor. Dette ble utført ved at et 75µm i.d kapillær ble installert i utgangen på EME-chipens kanal på akseptorsiden, slik at akseptorfasen ble ført direkte inn til UV-detektoren. På den måten ble det mulig å følge med på ekstraksjonsprosessen underveis i løpet av hele ekstraksjonstiden.

6.3.1 Gradientkonsentrasjon

I en serie med forsøk ble EME-chipen koblet til UV-detektor som beskrevet over. På donorsiden av EME-chipen ble det benyttet en HPLC-pumpe som vist på Figur 11. HPLC-pumpen fungerte da som donorpumpen i EME-oppsettet.



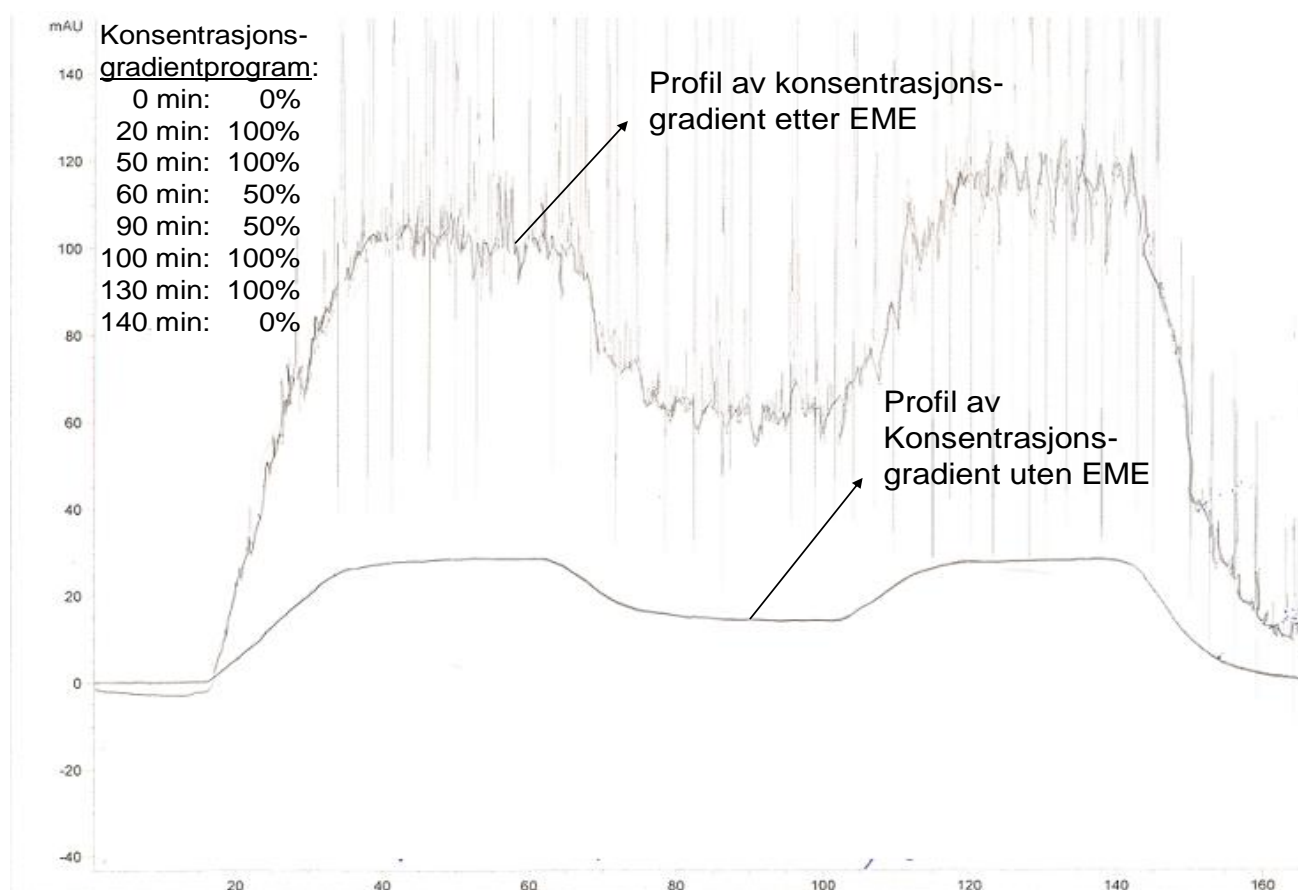
Figur 11. Skjematisk figur av on-chip EME med online UV- deteksjon og konsentrasjonsgradient i donorfase

Dette oppsettet gjorde det mulig å lage en konsentrasjonsgradient på donorfase som ble ført til EME-chipen, og i dette tilfelle kunne dermed konsentrasjonen på donorfase variere fra 0- 40 µg/mL. Samtidig ble det koblet på en splitt etter

donorpumpen slik at væskestrømmen ble delt i to. Splitten ledet den ene væskestrømmen direkte til UV-deteksjon uten EME, mens den andre væskestrømmen ble ledet til EME-chipen. Modellanalytten ble her elektromembranekstrahert over i akseptorløsningen som ble ledet videre direkte til UV-deteksjon. Det ble da mulig å følge med på effektiviteten av systemet, ved å se på analysesignalene med og uten ekstraksjon. Under disse forsøkene ble metadon benyttet som modellanalytt, 50mM NaH_2PO_4 innstilt med 1M NaOH til pH 7,4 ble benyttet som bakgrunnsanalytt i donorfase, mens 10mM maursyre ble brukt i akseptorfase. I Figur 12 er UV-signalet til metadon vist fra et elektromembranekstraksjonsforsøk på 160 minutter. I donorfase ble det kjørt et konsentrasjonsgradientprogram som angitt på figuren. Ved tiden 0 ble det kun pumpet natriumfosfatbuffer fra pumpe 1 i HPLC-pumpen til EME-chipen. Etter 20 minutter var konsentrasjonen på donorløsningen på maksimum nivå, 40 $\mu\text{g/mL}$ metadon, mens den sank til 50 % av maks konsentrasjon ved 60 minutter osv. De to grafene viser metadons UV-signal med og uten elektromembranekstraksjon, tatt opp online, noe som var mulig på grunn av splitten som var koblet på oppsettet som vist på Figur 11.

Grafene viser at løsningen som ble elektromembranekstrahert ble betydelig oppkonsentrert. Mens UV-signalet til metadon i en konsentrasjon 40 $\mu\text{g/mL}$ er på ca 20mAU uten utført elektromembranekstraksjon, ligger signalet på ca 100mAU etter elektromembranekstraksjon.

Det er noe støy på grafene som antageligvis skyldes gassbobler, men likevel viser grafene prinsippet at on-chip EME kan kobles online til en analysemetode og vise konsentrasjonssvingninger i donorfase.

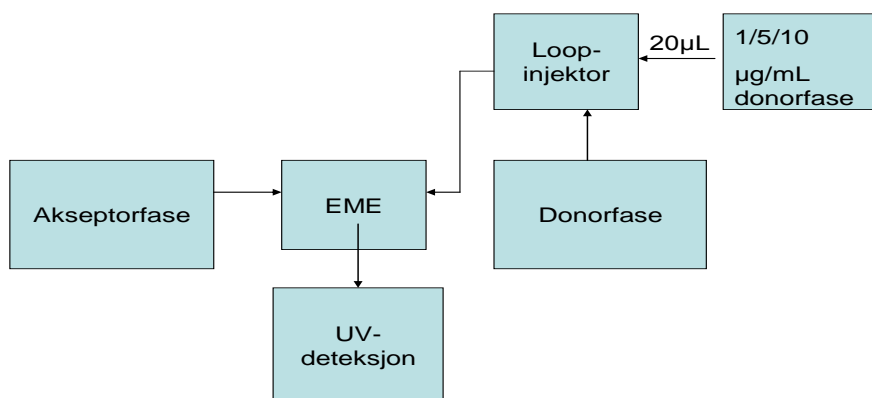


Figur 12. Online-UVsignal av metadon med og uten EME. Y-aksen viser absorbans i mAU, X-aksen viser tid i minutter. Konsentrasjonsgradientprogrammet for metadon er vist til venstre i figuren. Dette angir prosentvis konsentrasjon av donorløsningen av makskonsentrasjonen, 100%=40µg/mL metadon i 50mM NaH₂PO₄. Donorfasens flowhastighet var 18,9 µL/min. Akseptorfasen besto 100mM HCOOH, flowhastighet; 2,5µL/min. Spenning; 15V

6.3.2 Variasjon av ulik spenning

I disse forsøkene var on-chip EME-systemet koblet online til UV-deteksjon som beskrevet innledningsvis i kapittel 6.3 og de tradisjonelle sprøytepumpene beskrevet i kapittel 5.2.2 ble benyttet. Nytt med oppsettet var at det ble koblet til en loopinjektor på donorsiden av chipen, slik at donorløsningen ble pumpet gjennom loopinjektoren (Figur 13). Loopinjektoren gjorde det mulig å injisere ulike konsentrasjoner av donorfase, og donorfaser med en konsentrasjon på 1, 5, og

10 µg/mL av haloperidol og loperamid ble benyttet og injisert i volum på 20 µL inn i donorfase via loopen.

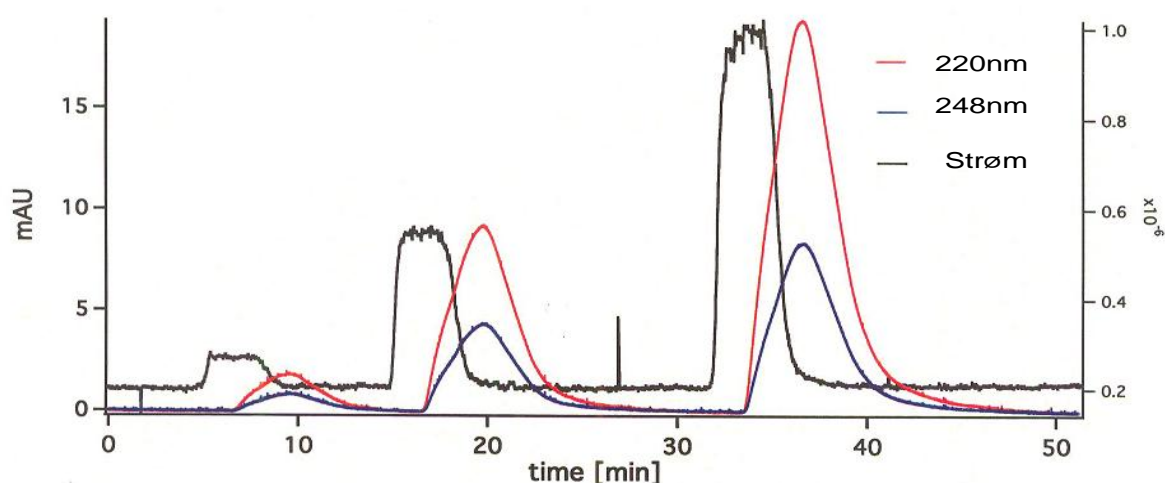


Figur 13. Skjematisk figur av EME-oppsettet tilkoblet en loopinjektor.

Under disse forsøkene ble både haloperidol og loperamid benyttet som modellanalytter, fordi de absorberer med ulik styrke på ulike bølgelengder. Sett ut ifra UV-spekter for stoffene, absorberer haloperidol likt ved bølgelengdene 220nm og 248nm, mens loperamid kun absorberer på 220nm. Haloperidols absorbans kunne da leses av direkte ved 248nm, mens loperamids absorbans ble funnet ved å trekke fra haloperidols absorbans på den totale absorbansen ved 220nm. Disse to bølgelengdene ble dermed benyttet under UV-deteksjonen.

100mM maursyre ble benyttet som bakgrunnsanalytter i både donor- og akseptor-løsningen. Da donorfase som løp i systemet ikke inneholdt modellanalyttene, med unntak av da loopinjeksjonen ble fortatt, ble det dannet topper for hver loopinjeksjon på UV-signalet. Figur 14 viser loopinjeksjoner på 20 µL av henholdsvis 1,5, og 10 µg/mL av modellanalyttene, injisert ved 4,14 og 31 minutter. Flowhastighetene var på 1 µL/min og 6 µL/min for henholdsvis akseptorfase og donorfase. I samme figur er også strømgrafene for ekstraksjonsserien plottet. Ved å sammenligne strømgrafene med grafene som viser UV-absorbans, er det tydelig at strømmen steg betydelig når de

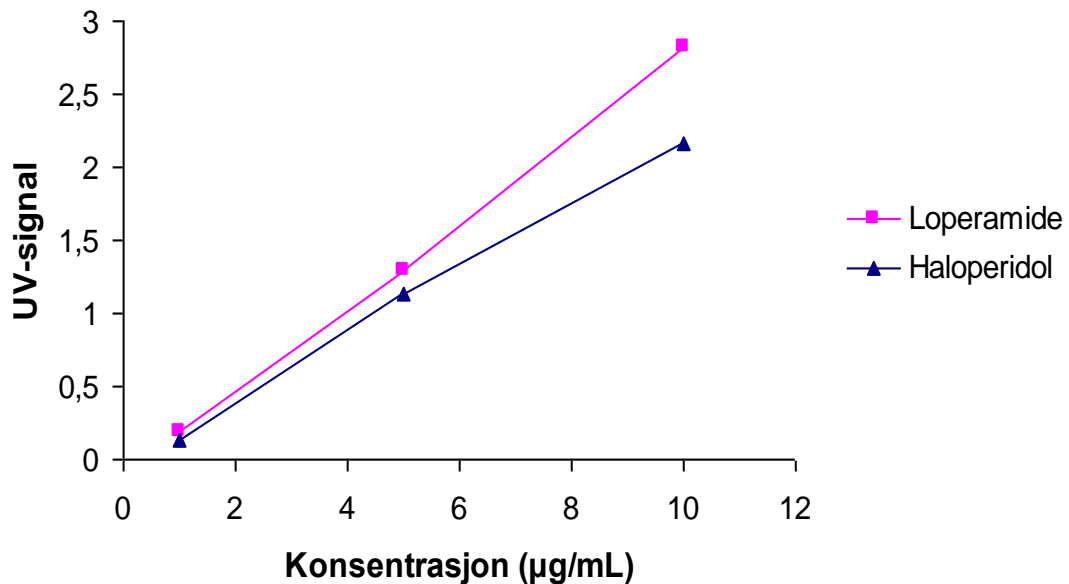
ulike konsentrasjonene ble ekstrahert over membranen. Det var i utgangspunktet veldig lav bakgrunnsstrøm, men denne steg i samme størrelsesorden som konsentrasjonene som ble injisert. Dette viser at det er en sammenheng mellom strømmen som løper i systemet og modellanalyttenes migrasjon over den kunstige væskemembranen. Ved å se på tidsintervallet mellom stigningen på strømgrafene og UV-grafene, passer denne tidsforsinkelsen tilnærmet eksakt med den tiden akseptorfase med analyttionene ville bruke på å passere kapillærets volum på 1,5 μL , fra EME-chipens kanalutgang på akseptorsiden og fram til UV-detektoren.



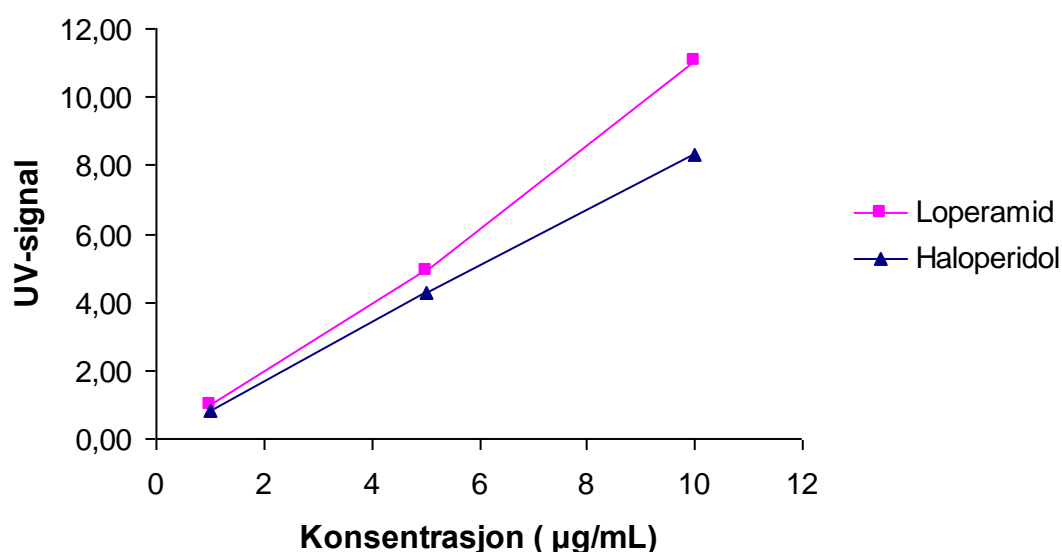
Figur 14. Ekstraksjonsseriens strømgraf samt online UV-signal ved 220nm og 248nm målt etter on-chip EME med loopinjeksjoner på 20 μL av 1, 5 og 10 $\mu\text{g/mL}$ haloperidol og loperamid i 100mM HCOOH i donorfase, flowhastighet; 6 $\mu\text{L/min}$. Akseptorfase; 100mM HCOOH , flowhastighet; 1 $\mu\text{L/min}$. Spenning 15V. Aksene på høyre side er strøm målt i ampere.

Fra samme ekstraksjonsserie ble UV-signalene til de to modellanalyttene plottet som funksjon av konsentrasjonen, både uten (Figur 15) og med (Figur 16) utført elektromembranekstraksjon før UV-analyse. Figurene viser at stoffene ble betydelig oppkonsentrert i EME-prosessen. Mens UV-signalet for 10 $\mu\text{g/mL}$ loperamid var på 2,83mAU uten elektromembranekstraksjon, ble UV-signalet for den samme

konsentrasjonen på 11,4mAU etter elektromembranekstraksjon. Videre vises det at UV-signalene var tilnærmet lineære i det gitte konsentrasjonsvinduet 1-10 $\mu\text{g/mL}$ for begge modellanalyttene etter utført elektromembranekstraksjon (Figur 16)



Figur 15. UV-signal av haloperidol og loperamid som funksjon av konsentrasjon uten utført elektromembranekstraksjon. De ulike konsentrasjonene på 1,5 og 10 $\mu\text{g/mL}$ ble injisert via loopinjektor i volum på 20 μL .

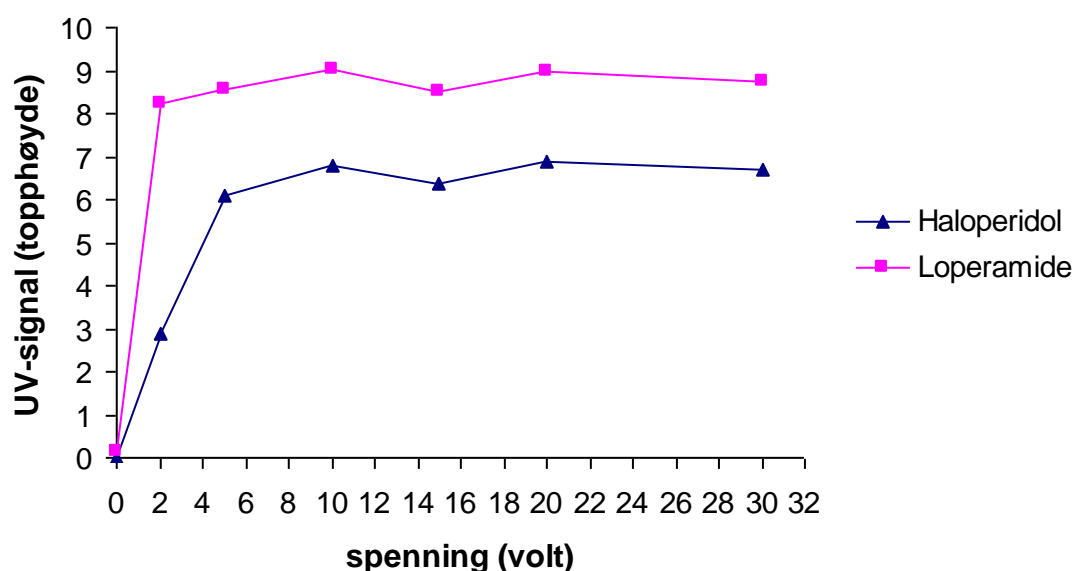


Figur 16 UV-signal av haloperidol og loperamid som funksjon av konsentrasjon etter utført elektromembranekstraksjon. De ulike konsentrasjonene på 1,5 og 10 µg/mL ble injisert via loopinjektor i volum på 20 µL. Donorfasen besto av 100mM HCOOH, flowhastighet; 6µL/min. Akseptorfasen; 100mM HCOOH, flowhastighet; 1µL/min. Spenning 15V. De to grafene er tilnærmet lineære (Haloperidol: $r^2 = 1,00$, Loperamid: $r^2 = 0,996$).

I tilsvarende forsøk ble ulike flowhastigheter på 3,9 og 12 µL/min ble prøvd ut, mens akseptorfasen sto uten variasjon på 1µL/min. Lignende resultater ble oppnådd for disse forsøkene.

I videre forsøk ble on-chip EME med online UV-deteksjon testet ut med å variere spenningen som ble pålagt systemet. Vanligvis ble systemet operert med et potensial på 15 V. I dette forsøket ble spenningen variert fra 0 til 30 V i løpet av 140 minutter. Mellom forandring av hver spenning, ble spenningen slått helt av, slik at UV-signalet falt til grunnlinjen. I Figur 17 er UV-signalet av de to modellanalyttene vist som funksjon av tiden. Tendensen her, samsvarer med resultatene beskrevet i kapittel 6.1.1. Ekstraksjonsutbytteverdiene inntar ett platå ved en viss spenning. Så lenge systemet ble operert på en spenning på ca 5-10 V, var det tilstrekkelig for å forbedre fordelingen til analyttene inn i membranen. Spenningen var da ikke lenger en

avgjørende faktor for stoffenes migrasjon over væskemembranen, men den var begrenset av stoffenes diffusjon i donorfase fram til membranen. Dette er også vist i nylig publisert arbeid[17, 19]. På bakgrunn av disse og tidligere resultater, ble det valgt å fortsette å operere EME-systemet på 15V.



Figur 17. UV-signal som funksjon av påført spenning. Akseptorfase besto av 100mM maursyre, donorfase besto av 100mM maursyre spiket med en konsentrasjon på 10 $\mu\text{g/mL}$ av modellanalyttene. Flowhastigheten var henholdsvis 1 og 3 $\mu\text{L/min}$ for akseptorfase og donorfase.

6.3.3 Oppkonsentring

For å oppnå høy oppkonsentrering av analyttene under ekstraksjonsprosessen, er det hensiktsmessig å ha et stort volumforhold mellom donorfase og akseptorfase. Dette kan oppnås i on-chip EME-systemet ved å stoppe akseptorfasens væskestrøm en periode under ekstraksjonsprosessen, slik at analyttene vil ekstraheres over i en stillestående akseptorfase. EME-systemet vil da ligne EME-systemet med akseptorreservoar som beskrevet under kapittel 6.1, men med større fordeler. Da akseptorfasens væskestrøm startes igjen, vil den føres direkte videre til deteksjon noe som effektiviserer og forenkler systemet betraktelig. I tillegg vil det være slik at når væskestrømmen stanses, vil kun volumet på 0,6 μL som rommer chipens kanal,

utgjøre akseptorløsningen. Dette gjør det mulig å oppnå svært store volumforhold mellom de to fasene i EME- systemet. Volumforholdene vil øke jo lengre ekstraksjonstiden er.

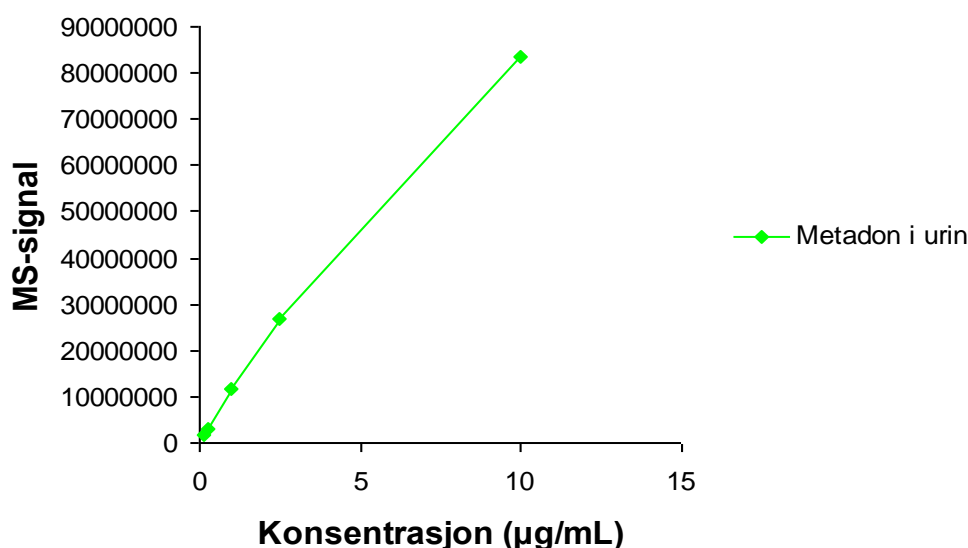
Stop-flow-forsøk med ulike flowhastigheter i donorfasen og i ulik tid ble prøvd ut. Da donorfasen hadde en flowhastighet på 12 $\mu\text{L}/\text{min}$, og akseptorfasen ble stoppet i 30 minutter, ble det oppnådd en oppkonsentreringsfaktor på 102 og 107 for henholdsvis haloperidol og loperamid. Dette viser at det er stort potensial i on-chip EME-systemet til å oppnå svært høy oppkonsentrering.

6.4 On-chip EME – Online MS-deteksjon

On-chip EME-systemet ble også koblet online til et massespektrometer med elektroprayionisasjon(ESI-MS). Selve EME-oppsettet var ellers uten forandringer, men akseptorfasen ble nå ledet fra akseptorkanalens utgang via et 50 μm i.d kapillær til MS-instrumentet.

6.4.1 Ekstraksjon av urinprøver

Som nevnt i kapittel 6.1.3 er det interessant å teste ut EME-systemets evne til å rense opp i en mer komplisert prøvematriks. Derfor ble urinprøver, spiket med metadon i ulike konsentrasjoner, testet på on-chip EME-systemet med online MS-analyse. De ulike konsentrasjonene ble injisert via loopinjektor i et volum på 20 μL inn i donorfasen som ble ledet til chipen (som på Figur 13, side 43). Hver konsentrasjon ble injisert to ganger. De ulike konsentrasjonene var på 0,1, 0,25, 1, 2,5 og 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 50 % maursyre/50 % urin (v/v). Som vist på Figur 18 var signalet for de ulike konsentrasjonene tilnærmet lineær. Dette viser at on-chip EME-systemet fungerer godt som en prøveopparbeidelsesmetode ved å isolere legemiddelet fra den biologiske matriksen.

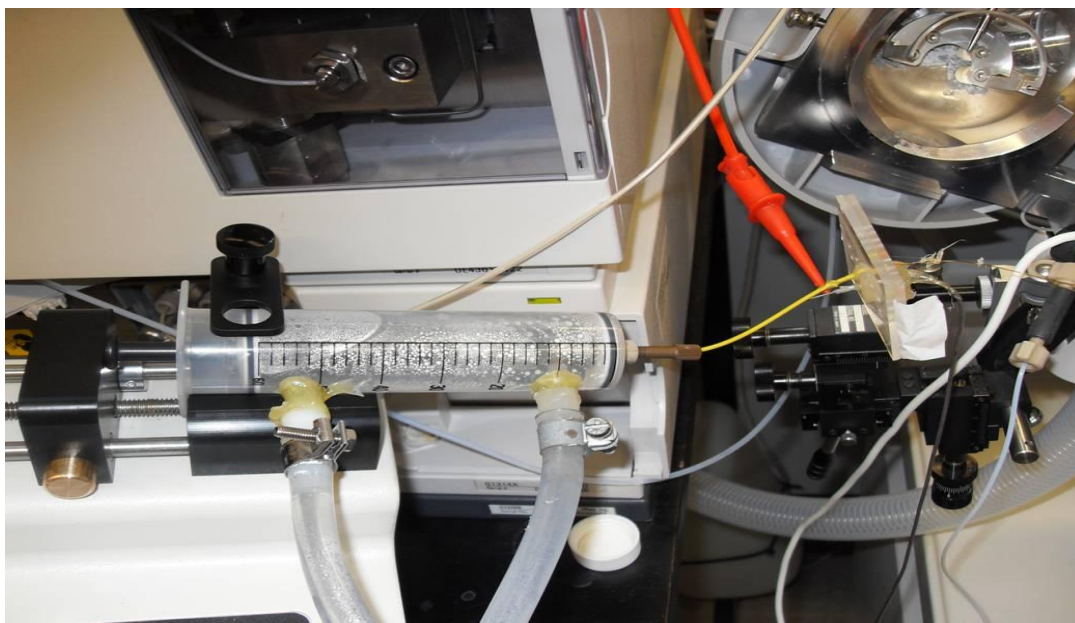


Figur 18. MS-signal fra on-chip EME med online MS-analyse av metadon med 5 ulike konsentrasjoner på 0,1, 0,25, 1, 2,5 og 10 µg/mL i 50 % maursyre/50 % urin (v/v). I begge fasene løp 100mM maursyre med en flowhastighet på 3,0µL/min på akseptorfasen og 9,0µL/min på donorfase. Spenning; 15 V. $r = 0,995$

6.4.2 Metabolisme av amitriptylin

Under denne delen presenteres forsøk der det ble jobbet med ekstraksjon av legemiddelet amitriptylin under metabolisme av mikrosomer fra rottelever. Da on-chip EME-systemet ble koblet online til MS-analyse gav det muligheten til å følge med på nedbrytingen av amitriptylin og danningen av metabolitter underveis. Elektromembranekstraksjon av amitriptylin var ikke prøvd ut tidligere i dette EME-systemet, men ble valgt på bakgrunn av at nortriptylin, som har fungert godt som modellanalytt, er en av hovedmetabolittene.

For å oppnå et gunstig miljø for mikrotomene, krevdes det ulike komponenter til tillagingen av løsningen som beskrevet i kapittel 5.5.2. Det var dermed en mer komplisert løsning som nå utgjorde donorfase i systemet. Løsningens pH var på 7,4 og den skulle holdes på ca 37 °C. Dette ble oppnådd ved å lage et sprøyteoppsett der donorsprøyten ble plassert i ett vannbad som vist på Figur 19.



Figur 19. On-chip EME koblet til online-MS. Sprøytepumpen på donorsiden inneholder metabolismeløsningen der amitriptylin blir metabolisert av rottemikrosomer. Selve donorsprøyten med metabolismeløsningen/donorfasen er plassert i den store sprøyten som fungerer som et vannbad.

Det ideelle for mikrosomløsningen ville være å ha fri lufttilførsel. Vanligvis ble det tilstrebet å unngå å ha luftbobler i donorsprøyten, fordi det kunne skape problemer med ujevn strøm. Nå ble en relativt stor luftboble laget med hensikt, samtidig som en magnet ble plassert i sprøyten. Ved å ha en magnet i sprøyten lot det seg gjøre å røre luftboblen rundt i sprøyten ved å manuelt føre en annen magnet på utsiden av sprøyten.

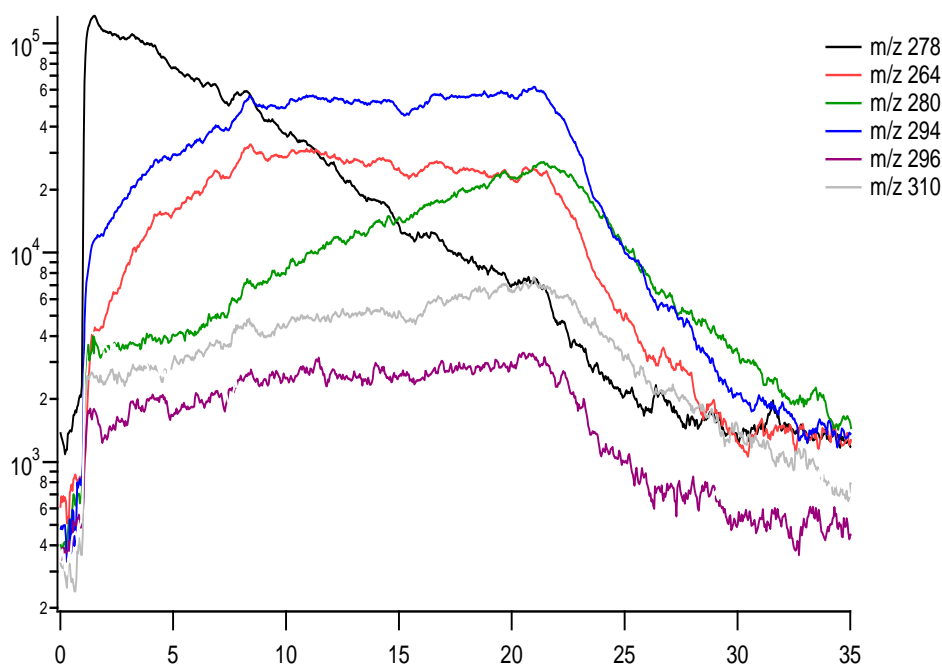
Selve metabolismereaksjonen startet i det man tilsatte den siste kritiske komponenten, kofaktoren NADPH til metabolismeløsningen. I et første innledende forsøk ble NADPH tilsatt metabolismeløsningen, og 20,0 μL av denne løsningen ble injisert via loopinjektor inn i donorfasen i jevne tidsintervaller (EME-oppsett som på Figur 13). 100mM maursyre løp både i akseptorfasen og donorfasen i EME-systemet, med en flow på henholdsvis 3,0 $\mu\text{L}/\text{min}$ og 9 $\mu\text{L}/\text{min}$. Donorfasen ble ført til chipen der elektromembranekstraksjonen foregikk. Akseptorfasens væskestrøm ble ledet direkte

til MS-analyse, og det ble da mulig å følge med på nedbrytningen av amitriptylin samt dannelse av nye metabolitter underveis i ekstraksjonen.

Det var kritisk at EME-systemet fungerte godt, slik at saltene og mikrosomsuspensjonen i donorfasen ikke ble ekstrahert over i akseptorfasen og videre ble ledet til MS-instrumentet. Den hydrofobe organiske væskemembranen så ut til å være en effektiv barriere for disse stoffene, og det var kun amitriptylin og andre metabolitter som gav høye signaler ved MS-analysen.

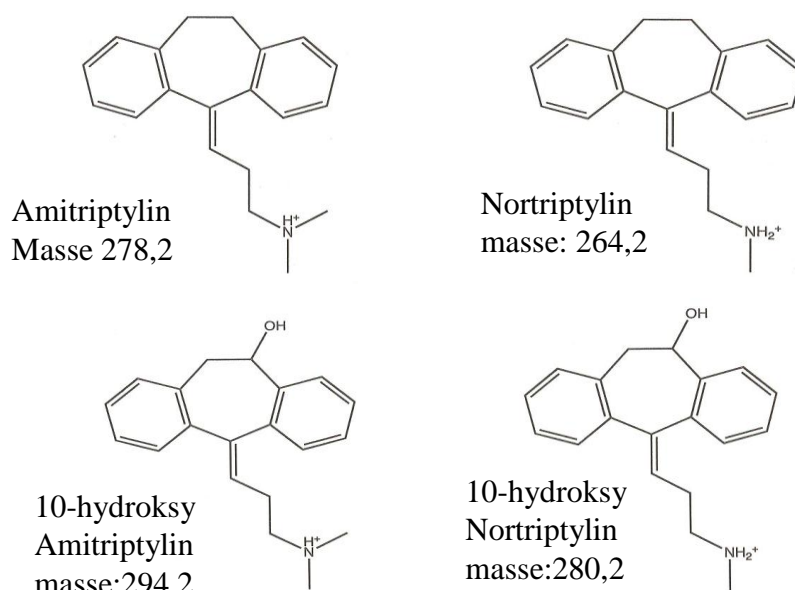
I de andre utførte forsøkene ble selve metabolismeløsningen plassert i donorsprøyten (som vist på Figur 19). Like etter NADPH ble tilsatt metabolismeløsningen, ble løsningen plassert over i donorsprøyten og pumpet mot elektromembranchipen i en hastighet på 3 μ L/min. Amitriptylin og dens metabolitter ble elektromembranekstrahert over i akseptorfasen bestående av 100mM maursyre som ble ledet til MS-instrumentet med en hastighet på 9 μ L/min.

På Figur 20 vises MS-signalene for amitriptylin samt detekterte metabolitter, de første 35 minuttene etter at reaksjonen har startet. Massekromatogrammet viser at amitriptylin med en m/z -verdi på 278,2 blir brutt ned, mens nortriptylin med m/z -verdi 264,2 og andre metabolitter blir dannet.



Figur 20..Metabolisme av amitriptylin og dannelse av metabolitter. Y-aksen= MS-signal, X-aksen = tid i minutter. De ulike grafene i massekromatogramet viser de ulike masse/ladning(m/z) som ble detektert. m/z 278,2 = amitriptylin, m/z 264,2= nortriptylin

I tillegg til nortriptylin ble 4 andre metabolitter også funnet, blant annet 10-hydroxy amitriptylin på m/z -verdien 294,2 og 10-hydroxy nortriptylin med m/z -verdien 280,2. Strukturformlene deres er vist i Figur 21.



Figur 21. Amitriptylin og tre andre detekterte metabolitter

Det ble også detektert metabolitter på m/z -verdiene 296,2 og 310,2. Metabolittfunnene i disse forsøkene samsvarer med andre studier der metabolitter av amitriptylin er beskrevet [25, 26]

Ved å følge nedbrytingen av amitriptylin var det mulig å beregne en halveringstid på nedbrytingsreaksjonen som foregår. Dette ble gjort basert på de 30 første minuttene av reaksjonen, ved å ta utgangspunkt i at nedbrytingen skjer med 1.ordens kinetikk som kan beskrives ved Ligning 5 side 28.

Ved 5 paralleller ble gjennomsnittshalveringstiden, $T_{1/2}$, beregnet til 4,75minutter (RSD = 5,7 %).

7. Konklusjon

I denne oppgaven er det for første gang demonstrert EME i et chipformat, der både akseptorfasen og donorfasen ble pumpet i en jevn væskestrøm forbi den kunstige væskemembranen.

I forsøkene ble det undersøkt hva flowhastigheten på akseptorfasen og donorfasen hadde av betydning for ekstraksjonsutbyttet i EME-systemet, og det ble vist at ekstraksjonsutbyttet for modellanalyttene ble redusert ved økt flowhastighet i donorfasen. Dette forklares ved at analyttens residensetid ved den kunstige væskemembranen vil bli mindre jo hurtigere flowen i donorkanalen er. Det ble også vist at flowhastigheten på akseptorfasen i liten grad påvirket ekstraksjonsutbyttet. Følgelig er det donorflowen som er avgjørende for EME-systemets ekstraksjonsevne.

Videre ble det bekreftet at om spenningen som blir lagt på EME-systemet er på 5-15V, vil ikke lenger spenningen være den begrensende faktoren for ekstraksjonen.

Det organiske løsemiddelet NPOE ble benyttet og fungerte godt som den kunstige væskemembranen i EME-systemet. Likevel ble de tre organiske løsemidlene 2-Nitrofenylpentyleter, 2,4-Dimetyl-1-nitrobenzen, 1-Etyl-2-nitrobenzen prøvd ut. Det ble vist at ekstraksjonsutbyttet for modellanalyttene ikke varierte signifikant ved å benytte de andre organiske løsemidlene som den kunstige væskemembranen. Det ble derfor valgt å benytte NPOE i det videre arbeidet.

Det mest spennende og lovende med on-chip EME ble vist da EME-systemet ble koblet online til UV- og MS-analyse. Da ble det blant annet vist at ved å stoppe akseptorfasens flow under en ekstraksjon ble det oppnådd en oppkonsentreringsfaktor på opptil 107. Videre ble det vist at EME-systemet hadde en svært god evne til å rense opp i mer komplisert biologisk prøvematriks. Dette ble vist da urinprøver ble ekstrahert med svært god opprensing og høyt ekstraksjonsutbytte, og ved EME av

legemiddelet amitriptylin og dannede metabolitter, under metabolisme av rottemikrosomer med påfølgende online-analyse på MS.

Dette er første gang EME er utført i dette formatet, og følgelig gjenstår arbeid for å videreutvikle systemet. Likevel viser prosjektet at det ligger et stort potensial i bruksområdet til on-chip EME-systemet som en enkel, rask og effektiv prøveopparbeidelsesmetode som kan benyttes til både offline-, og ikke minst online-analyse av legemidler.

8. Kildeliste

1. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 2004, [Bergen]: Fagbokforl. 503 s.
2. Gjelstad, A., *Hvordan kombinere strøm med kunstige væskemembraner for isolering og oppkonsentrering av legemidler fra små prøvevolum?* Norsk Faramceutisk Tidsskrift, 2007(1): p. 31-32.
3. Psillakis, E. and N. Kalogerakis, *Developments in single-drop microextraction*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2002. **21**(1): p. 54-64.
4. Audunsson, G., *Aqueous/aqueous extraction by means of a liquid membrane for sample cleanup and preconcentration of amines in a flow system*. Analytical Chemistry, 1986. **58**(13): p. 2714-2723.
5. Jönsson, J.Å. and L. Mathiasson, *Liquid membrane extraction in analytical sample preparation: II. Applications*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1999. **18**(5): p. 325-334.
6. Jönsson, J.Å. and L. Mathiasson, *Supported liquid membrane techniques for sample preparation and enrichment in environmental and biological analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1992. **11**(3): p. 106-114.
7. Jönsson, J.Å. and L. Mathiasson, *Liquid membrane extraction in analytical sample preparation: I. Principles*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1999. **18**(5): p. 318-325.
8. Jeannot, M.A. and F.F. Cantwell, *Solvent Microextraction as a Speciation Tool: Determination of Free Progesterone in a Protein Solution*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(15): p. 2935-2940.
9. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005. **817**(1): p. 3-12.
10. Jeannot, M.A. and F.F. Cantwell, *Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(2): p. 235-239.
11. Jeannot, M.A. and F.F. Cantwell, *Solvent Microextraction into a Single Drop*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(13): p. 2236-2240.
12. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Anal Chem, 1999. **71**(14): p. 2650-6.
13. Rasmussen, K.E., et al., *Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr A, 2000. **873**(1): p. 3-11.
14. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. J Chromatogr A, 2006. **1109**(2): p. 183-90.
15. Gjelstad, A., et al., *Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields*. J Chromatogr A, 2007. **1157**(1-2): p. 38-45.

16. Gjelstad, A., K.E. Rasmussen, and S. Pedersen-Bjergaard, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances*. J Chromatogr A, 2006. **1124**(1-2): p. 29-34.
17. Kjelsen, I.J., et al., *Low-voltage electromembrane extraction of basic drugs from biological samples*. J Chromatogr A, 2008. **1180**(1-2): p. 1-9.
18. Balchen, M., et al., *Rapid isolation of angiotensin peptides from plasma by electromembrane extraction*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(41): p. 6900-5.
19. Petersen, N.J., et al., *Drop-to-drop microextraction across a supported liquid membrane by an electrical field under stagnant conditions*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(9): p. 1496-502.
20. Pedersen-Bjergaard, S., et al., *Liquid-phase microextraction of basic drugs--selection of extraction mode based on computer calculated solubility data*. J Sep Sci, 2005. **28**(11): p. 1195-203.
21. Balchen, M., et al., *Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane*. J Chromatogr A, 2007. **1152**(1-2): p. 220-5.
22. Zhang, D., M. Zhu, and W.G. Humphreys, *Drug metabolism in drug design and development: basic concepts and practice*. 2008, Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience. XXI, 609 s.
23. Petersen, N.J., et al., *On-chip electro membrane extraction*. Microfluidics and Nanofluidics, 2010(In press).
24. Balchen, M., et al., *Potential-driven peptide extractions across supported liquid membranes: Investigation of principal operational parameters* Journal of Separation Science 2010. **33**(11): p. 1-8.
25. Edelbroek, P., E. de Haas, and F. de Wolff, *Liquid-chromatographic determination of amitriptyline and its metabolites in serum, with adsorption onto glass minimized*. Clin Chem, 1982. **28**(10): p. 2143-2148.
26. Rousu, T., J. Herttuainen, and A. Tolonen, *Comparison of triple quadrupole, hybrid linear ion trap triple quadrupole, time-of-flight and LTQ-Orbitrap mass spectrometers in drug discovery phase metabolite screening and identification <I>in vitro</I> - amitriptyline and verapamil as model compounds*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010. **24**(7): p. 939-957.